

УДК 578.28:598.2

К.А. Шаршов, В.Ю. Марченко, А.К. Юрлов*, А.М. Шестопалов**ЭКОЛОГИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА H5N1
В РОССИИ (2005–2012 ГГ.)**

**Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирская область,
р.п. Кольцово)
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (Новосибирск)
* Институт систематики и экологии животных СО РАН (Новосибирск)**

Россия охватывает большую часть Евразии и представляет особый интерес для экологии вирусов гриппа и их эволюции. Важность этого региона была подтверждена вспышками птичьего гриппа H5N1, зафиксированными среди диких птиц с 2005 по 2010 годы. В статье содержится подробный сравнительный анализ вирусологических, молекулярно-биологических и патогенетических характеристик вирусов H5N1-субтипа, изолированных в России. Это исследование свидетельствует о необходимости постоянного наблюдения для обнаружения новых вариантов вирусов гриппа, чтобы способствовать предотвращению новых вспышек.

Ключевые слова: высокопатогенный вирус гриппа птиц, эволюция, вспышки

**ECOLOGY AND EVOLUTION OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA H5N1
IN RUSSIA (2005–2012)****K.A. Sharshov, V.Yu. Marchenko, A.K. Yurlov, A.M. Shestopalov**

**State Research Center of Virology and Biotechnology «VECTOR», Koltsovo
Novosibirsk State University, Novosibirsk
Institute of Systematic and Ecology of Animals SB RAMS, Novosibirsk**

Russia covering a large part of Eurasia is of special interest for influenza virus ecology and evolution. The importance of this region has been confirmed by the previous outbreaks of HPAI H5N1 among wild birds from 2005 to 2010. Avian influenza virus surveillance is an important task prior the fundamental study and introduction these data in practice. The article contains detailed comparative virological, molecular, pathogenic characteristics of H5N1 viruses isolated in Russia. Some molecular-epidemiological aspects are discussed. This study demonstrates the need for ongoing surveillance to detect new variants of influenza viruses and facilitate prevention of outbreaks.

Key words: highly pathogenic avian influenza, evolution, outbreaks

Грипп птиц — болезнь, отнесенная Всемирной организацией здоровья животных (ОИЕ) к наиболее важным инфекционным болезням человека и животных. До недавнего времени грипп птиц рассматривался как зоонозное заболевание птиц локального значения. Однако появление и распространение HPAI H5N1 (Highly Pathogenic Avian Influenza) азиатского происхождения изменило ситуацию: вместе с вызванной вирусом гибелью миллионов диких и домашних птиц HPAI H5N1 оказался способным инфицировать широкий спектр хозяев, включая человека.

В течение 2010–2012 гг. эпизоотии среди диких и домашних птиц были зарегистрированы в большинстве стран Юго-Восточной Азии, Китае, Японии, Корее, Индии, Бангладеш, Монголии, Румынии, Болгарии и России [5]. Помимо огромного ущерба экономике и природным ресурсам, на **7 июля 2012 г.** в мире было документировано 606 случаев инфицирования людей, из которых 357 окончились летальным исходом [1].

Вирус гриппа птиц H5N1-субтипа впервые был выделен от кур в 1959 г. в Шотландии. Позднее вирусы гриппа этого субтипа выделялись в 1975, 1981, 1983 гг. в Северной Америке и в 1991 г. — в Англии и Шотландии [25]. Вплоть до 1996 г. ничто не указыва-

ло на возможность того, что H5-вирус гриппа может приобрести способность инфицировать людей, приводя к летальным случаям. Предшественник вируса гриппа H5N1-субтипа, который инфицировал людей, был вначале обнаружен в 1996 г. в провинции Гуандон (Guangdong), Китай. В 1996 г. там была зарегистрирована вспышка гриппа птиц с летальными случаями среди домашних гусей, которая не привлекла большого внимания [9]. Было показано, что выделенный во время эпизоотии штамм приобрел гены внутренних белков (NS, PB1, PB2, NP) от варианта вируса гриппа, позже обнаруженного у перепела (A/Quail/HK/G1/97, H9N2), и ген NA от вируса утки (A/Teal/HK/W312/97, H6N1), прежде чем стал широко распространенным на рынке живой домашней птицы в Гонконге [12]. Штамм A/Goose/Guangdong/1/96 является самым ранним известным предком циркулирующего сегодня вируса. Вся домашняя птица, инфицированная этим вариантом в Гонконге, была уничтожена, и позднее данный генотип не обнаруживался среди циркулирующих вариантов. Вместе с тем, различные реассортанты, которые содержали тот же самый ген гемагглютинаина H5, но имели различные внутренние гены, продолжали выявляться среди гусей и уток [16]. Вирусы H5N1 продолжали эво-

люционировать, и в конце 2002 г. стали причиной гибели большого числа диких, домашних и экзотических птиц в природных парках Гонконга [22, 27], а также смогли преодолеть межвидовой барьер и инфицировать людей [26]. Считается, что с 2003 г., вирус H5N1 стал доминирующим повсеместно в Юго-Восточной Азии, включая Вьетнам, Таиланд, Индонезию, Камбоджу, Лаос, Корею, Японию, Китай и Малайзию [9, 13]. В дальнейшем, продолжая эволюционировать, этот вариант H5N1 дал начало новым генетическим ветвям. Так, показано, что вирус гриппа H5N1, который вызвал эпизоотии среди домашних птиц в Японии и Корее, генетически отличен от всех остальных [17, 14]. Филогенетический анализ более поздних штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1 показал, что штаммы, изолированные во Вьетнаме и Таиланде, сформировали группу, которая оказалась отличной от индонезийской группы.

Несмотря на генетические отличия вируса H5N1, выделенного в различных регионах, разные варианты этого вируса оставались высокопатогенными для домашних птиц и вызывали летальные случаи инфекции у человека. До настоящего времени более 140 млн. домашних птиц в мире погибло от H5N1 или было уничтожено как потенциально инфицированных им [5, 9].

В 2008 г. три крупнейшие международные организации (ВОЗ (WHO), Международное эпизоотическое бюро (OIE) и Организация по сельскому хозяйству и продовольствию ООН (FAO)) опубликовали универсальную систему классификации вируса гриппа H5N1-субтипа, созданную на основе филогенетического анализа гена HA. Согласно этой системе выделяют несколько групп — клад и субклад, имеющих происхождение от единого предка. Выделено 10 клад (0—9 clades), представители которых преимущественно распространены в конкретных географических регионах. Классификация основана на топологии филогенетического древа известных штаммов H5N1. При этом отдельные клады должны генетически отличаться более чем на 1,5 % [31].

Наибольшее распространение в мире получил вирус клады 2.2. По этой причине 2009 году ее структура была детализирована [30]. При дальнейшей диверсификации были выделены субклада 2.2.1 и три сублинии (I, II и III).

Эволюция азиатского варианта H5N1 шла, главным образом, в результате появления точечных мутаций в гене PB2, инсерций в гене HA и делеций в генах NA и NS [17]. Таким образом, H5N1-вирусы продолжают эволюционировать посредством мутирования с последующей реассортацией мутированных геномов [15, 20]. В то время как большинство штаммов H5N1, изолированных от птиц в Азии, начиная с 1997 г., являются высокопатогенными для домашних кур, они проявляют различную патогенность для других видов птиц и млекопитающих. Так, у домашних уток уровень патогенности штаммов H5N1 варьирует от высокопатогенного до непатогенного. У хорьков большинство штаммов, полу-

ченных от птиц, вызывают инфекции дыхательных путей, либо обладают нейротропными свойствами, вызывая параличи конечностей [23]. Все штаммы H5N1, выделенные от человека, являются высокопатогенными для хорьков [23].

Существующие в настоящее время данные позволяют судить о различиях в патогенном потенциале выделяемых в мире вариантов H5N1 для млекопитающих [9, 23]. Вместе с тем, информации об этом важнейшем свойстве вируса A/H5N1, циркулировавшего в России, крайне мало. Поэтому актуальным являлось проведение сравнительного изучения основных патогенных свойств штаммов вируса гриппа H5N1-субтипа, выделенных в России.

В настоящее время ряд исследователей считает, что ведущая роль в распространении в мире высокопатогенного H5- и H7-гриппа принадлежит людям [19]. Тем не менее, не исключается механизм распространения гриппа через перемещение инфицированной домашней птицы. Это подтверждается тем, что впервые вспышки высокопатогенного гриппа H5N1 были зафиксированы на фермах промышленного сельского хозяйства. Крупнейшее в мире производство домашней птицы находится в Китае, Вьетнаме, Таиланде и Индонезии. Рынки живой птицы играют роль своеобразного резервуара и, вероятно, поддерживают циркуляцию и распространение вируса гриппа H5N1 в конкретном регионе [29]. Поэтому важной мерой защиты и контроля заболевания является вопрос биобезопасности в сельском хозяйстве. Множество других факторов делают контроль над этой инфекцией затруднительным. Например, содержание домашних птиц на частном подворье обычно не сопровождается выполнением требований биобезопасности. Помимо этого, следует отметить, что, многие из стран, подверженных эпизоотии, имеют слабую ветеринарную инфраструктуру [19].

Другим мощным фактором, играющим важную роль в распространении инфекции, является миграция уток, концентрирующихся на зимовках в Юго-Восточной Азии и часто контактирующие с домашними птицами и человеком [28, 19]. Вместе с тем, в литературе встречается крайне мало данных об этом важнейшем факторе распространения гриппа H5N1-субтипа на территории России.

Следует отметить, что в целом патогенные свойства в отношении млекопитающих и птиц на протяжении 5 лет распространения вируса в России существенно не изменились. В ряде работ показано незначительные отличия в степени патогенности [4, 7, 11, 12, 21].

Важно, что в отличие от многих стран Юго-Восточной Азии и Ближнего Востока в России не было зарегистрировано случаев инфекции H5N1 у людей [1].

Анализ литературных данных показывает, что эпизоотия гриппа H5N1 распространилась в осенне-зимний период 2005—2006 гг. на территории большинства стран Европы и Передней Азии, а впоследствии и в Африке [9, 21]. Анализ

полученных нами результатов и данных ряда исследователей [4, 7, 9, 11, 12, 19, 21] позволяют с наибольшей вероятностью говорить о ведущей роли диких птиц в распространении высокопатогенного варианта вируса гриппа H5N1-субтипа, начиная с весны 2005 г.

Полученные нами штаммы, которые составляют основу организованной коллекции ВГА, были идентифицированы как относящиеся к различным систематическим группам вируса гриппа. К настоящему времени описано множество линий и штаммов вируса H5N1 [9, 30, 31]. Изучение изолятов, выделенных в России, дополняет общую картину эволюции вируса гриппа H5N1. Гетерогенность вируса гриппа по различным биологическим свойствам была показана и в целом ряде работ по изучению штаммов, выделенных в России [4, 7, 9, 11, 12, 19, 21].

Так, штаммы H5N1-субтипа гетерогенны по значению индекса патогенности (Intravenous pathogenicity index, IVPI). Существование штаммов с различным IVPI, значение которого варьирует в зависимости от нуклеотидных замен в генах структурных и неструктурных белков, было показано ранее [28]. Для различных штаммов IVPI (Intravenous pathogenicity index) имел значение от 1,50 до 3,00 [28]. За исключением одного штамма, выделенного от сизой чайки, все выделенные нами штаммы H5N1-субтипа характеризовались значением IVPI > 2,7 и были отнесены к высокопатогенным [7, 11, 18]. При экспериментальной инфекции они вызывали гибель развивающихся куриных эмбрионов и лабораторных животных (куры, мыши).

Многочисленные исследования позволили определить место штаммов, циркулирующих на территории России, в систематической номенклатуре ВГА. Было показано, что вирусы субклады 2.2, которые получили широкое распространение осенью 2005 г. на территории Евразии и Африки, начали свое движение летом 2005 г. именно с территории юга Западной Сибири. До 2009 г. представители вируса гриппа субклады 2.2 вызывали вспышки на территории Евразии и Африки. В 2009 – 2010 гг. было документировано появление на юге Западной Сибири генотипа 2.3.2, циркулировавшего ранее, в основном, в южных провинциях Китая, Гонконге и Вьетнаме [22, 31]. Следует отметить, что ВГА других клад на территории России не было выявлено. Этот факт согласуется с данными литературы о преимущественном локальном географическом существовании большинства клад в Юго-Восточной Азии [9, 17, 31].

Возвращаясь к вопросу о роли мутационного процесса в эволюции ВГА, следует отметить, что вирус гриппа А динамически изменяется, чтобы уклониться от действия популяционного иммунитета. При этом постоянный мутационный процесс поверхностных белков (антигенный дрейф) или их полная замена путем реассортации соответствующих генов (антигенный сдвиг) приводит к усовершенствованию способности вируса гриппа А уклоняться от иммунного ответа [13, 15]. Анти-

генный сдвиг значительно увеличивает число случаев заболевания гриппа (развитие пандемии) и уровень смертности в популяции. Вместе с тем, гибель животных или людей, инфицированных высокопатогенными вариантами вируса, равно как и давление иммунного ответа, способствуют преимущественной селекции вирусных изолятов, обладающих сниженным патогенным потенциалом. Действительно, для ряда вирусных заболеваний было показано, что в процессе эволюции инфекционного агента наблюдается переход от острого течения заболевания, вызываемого ими, к хроническим формам, что непосредственно связано с патогенностью вируса [28].

Таким образом, продолжающаяся эволюция в высокопатогенный вирус H5N1-субтипа является важным аспектом для эпидемиологии и эпизоотологии как в России, так и в мире в целом. Постоянно выявляемые эпизоотии гриппа H5N1 диких и домашних птиц, а также гибель людей, свидетельствуют о возможности возникновения новой пандемии и панзоотии гриппа этого субтипа и требуют пристального внимания общества к этой проблеме.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 12.741.12.0153, № 16.740.11.0179, № 02.740.11.0709, № 11.519.11.2014) и грантом по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Доступно на http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_08_12/en/index.html
2. Выявление в Западной Сибири высокопатогенных H5N1-вирусов гриппа, генетически родственных вирусам, циркулирующим в Юго-Восточной Азии в 2003 – 2005 гг. / Г.Г. Онищенко [и др.] // Доклады РАН. – 2006. – Т. 406, № 2. – С. 278 – 280.
3. Изоляция высокопатогенных (HPAI) штаммов вируса гриппа А/H5N1 от диких птиц в очаге эпизоотии на озере Убсу-Нур (июнь 2006 г.) и их депонирование в Государственную Коллекцию вирусов РФ (03 июля 2006 г.) / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2006. – Т. 51. – № 6. – С. 14 – 18.
4. Изучение патогенности штаммов вируса гриппа птиц H5N1-субтипа, выделенных на территории Российской Федерации, на мышинной модели / А.М. Шестопалов [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 9. – С. 317 – 319.
5. Международное эпизоотическое бюро (World Organisation for Animal Health) Доступно на http://www.oie.int/eng/info_ev/en_AI_factoids_H5N1_Timeline.htm
6. Расшифровка эпизоотической вспышки среди диких и домашних птиц на юге европейской части России в декабре 2007 г. / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2008. – № 4. – С. 18 – 22.

7. Характеристика высокопатогенного штамма вируса гриппа H5N1-субтипа, выделенного от сизой чайки (*Larus canus*) / К.А. Шаршов [и др.] // Журн. Микробиол. — 2010. — № 1. — С. 29–32.
8. Эпизоотия среди диких и домашних птиц, вызванная высоковирулентным вирусом гриппа А/H5N1 генотипа 2.2 (Цинхай-сибирский), на пути осенних миграций в северо-восточной части бассейна Азовского моря (Краснодарский край) / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. — 2008. — № 2. — С. 14–18.
9. Alexander D.J., Brown I.H. History of highly pathogenic avian influenza // *Rev Sci Tech.* — 2009. — Apr; 28 (1). — P. 19–38.
10. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* / Chen H. [et al.]. — 2005. — Jul 14. — Vol. 436 (7048). — P. 191–192.
11. Avian influenza (H5N1) outbreak among wild birds, Russia, 2009 / K. Sharshov [et al.] // *Emerg Infect Dis.* — 2010. — Feb; Vol. 16 (2). — P. 349–351.
12. Avian influenza in Hong Kong 1997–2002 / L.D. Sims [et al.] // *Avian Dis.* — 2003; Vol. 47 (3). — P. 832–838.
13. Capua I., Alexander D.J. Ecology, epidemiology and human health implications of avian influenza viruses: why do we need to share genetic data? // *Zoonoses Public Health.* — 2008. N 55 (1). — P. 2–15.
14. Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003-2004 influenza outbreaks in Japan / M. Mase [et al.] // *Virology.* — 2005. — Feb; 5; Vol. 332 (1). — P. 167–176.
15. Chen J., Deng Y.M. Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics // *Virol J.* — 2009. — N 6. — P. 30.
16. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR / Y. Guan [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2002. — Jun 25; Vol. 99 (13). — P. 8950–8955.
17. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern / K.S. Li [et al.] // *Asia. Nature.* — 2004. — Jul 8; Vol. 430 (6996). — P. 209–213.
18. Genetic and biological characterization of avian influenza H5N1 viruses isolated from wild birds and poultry in Western Siberia / K. Sharshov [et al.] // *Arch Virol.* — 2010. — Jul; Vol. 155 (7). — P. 1145–1150.
19. H5N1 outbreaks and enzootic influenza / R.G. Webster [et al.] // *Emerg Infect Dis.* — 2006. — Jan; 12 (1). — P. 3–8.
20. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds / J. Liu [et al.] // *Science.* — 2005. — Aug 19; 309 (5738). — P. 1206.
21. Influenza (H5N1) viruses in poultry, Russian Federation, 2005–2006 / A.S. Lipatov [et al.] // *Emerg Infect Dis.* — 2007. — Apr; Vol. 13 (4). — P. 539–546.
22. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002 / T.M. Ellis [et al.] // *Avian Pathol.* — 2004. — Oct; Vol. 33(5). — P. 492–505.
23. Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004 / E.A. Govorkova [et al.] // *J. Virol.* — 2005. — Feb; Vol. 79 (4). — P. 2191–2198.
24. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens / D.J. Hulse [et al.] // *J. Virol.* — 2004. — Sep; Vol. 78 (18). — P. 9954–9964.
25. Perdue ML. Evolution of H5 subtype avian influenza A viruses in North America / M. Garcia [et al.] // *Virus Res.* — 1997. — Oct; 51 (2). — P. 115–124.
26. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease / J.S. Peiris [et al.] // *Lancet.* — 2004. — Feb 21; Vol. 363 (9409). — P. 617–619.
27. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks / K.M. Sturm-Ramirez [et al.] // *J. Virol.* — 2004. — May; 78 (9). — P. 4892–4901.
28. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia / D.J. Hulse-Post [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2005. — Jul 26; Vol. 102 (30). — P. 10682–10687.
29. The impact of a monthly rest day on avian influenza virus isolation rates in retail live poultry markets in Hong Kong / N.Y. Kung [et al.] // *Avian Dis.* — 2003. — Vol. 47 (3 Suppl). — P. 1037–1041.
30. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. 2009. Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. *Influenza Other Respir. Viruses* 3. — P. 59–62
31. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) / WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group // *Emerg Infect Dis.* — 2008. — N 14 (7). — P. 1.
32. Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) / J. Keawcharoen [et al.] // *Emerg Infect Dis.* — 2008. — Apr; Vol. 14 (4). — P. 600–607.

Сведения об авторах

Шаршов Кирилл Александрович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» (630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово; тел./факс: 8 (383) 336-75-40, e-mail: Sharshov_ka@vector.nsc.ru)

Марченко Василий Юрьевич – научный сотрудник Новосибирского национального исследовательского государственного университета

Юрлов Александр Константинович – кандидат биологических наук, заведующий отделом ФГБУН Института систематики и экологии животных СО РАН (630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 11)

Шестопалов Александр Михайлович – доктор биологических наук, заведующий отделом Новосибирского национального исследовательского государственного университета