

БИОЛОГИЯ

УДК 578.832.1:578:4

МРНТИ 34.27.29

**С. Е. Асанова, А. И. Кыдырманов, К. О. Карамендин,
Е. Т. Касымбеков, К. Д. Даулбаева, К. Х. Жуматов,
М. Х. Саятов**

Институт микробиологии и вирусологии,
г. Алматы, Казахстан

НОВЫЙ ШТАММ ВИРУСА ГРИППА А/БЕЛОЛОБЫЙ ГУСЬ/ЦЕНТРАЛЬНЫЙ КАЗАХСТАН/3733/09 (H5N3) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА А/Н5 ДИКИХ И ДОМАШНИХ ПТИЦ

Изучены биологические и молекулярно-генетические свойства нового штамма вируса гриппа А/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09 (H5N3), отличающегося от эталонных и ранее выделенных вариантов этого подтипа. Низкие патогенные свойства позволяют рекомендовать его для использования в качестве диагностикума в практических вирусологических лабораториях при расшифровке этиологии эпидемических и эпизоотических вспышек гриппа, а также для оценки напряженности популяционного иммунитета у домашних и диких птиц.

Ключевые слова: штамм, вирус гриппа, гемагглютинин, нейраминидаза, иммунная сыворотка, филогенетический анализ, диагностикум, дикая птица.



Эталондық H5N3 және ертеректе бөлінген осы нұсқадағы субтиптерден ерекшеленетін тұмау вирусының А/Ақмаңдайлы қаз/Орталық Қазақстан/3733/09 (H5N3) жаңа штамының биологиялық және молекулярлы-генетикалық қасиеттері зерттелді. Патогендігі төмен қасиеті, оны тәжірибелік вирусология зертханаларында эпидемиялық және эпизоотиялық тұмаудың этиологиясын анықтауда диагностикум ретінде қолдануға, сонымен қатар жабайы және үй құстарының популяциялық иммунитетінің кернеуді бағалау үшін ұсынуға болады.

Түйінді сөздер: штамм, тұмау вирусы, гемагглютинин, нейраминидаза, иммундық қан сары суы, филогенетикалық анализ, диагностикум, жабайы құс.

Biological and genetic properties of the new strain of influenza virus A/White-fronted Goose/Central Kazakhstan/3733/09 (N5N3), which differs from the reference and previously isolated variants of this subtype were studied. Low pathogenic properties allow to recommend it for use as diagnostic in a practical virology laboratories in deciphering the etiology of epidemic and epizootic outbreaks, as well as, to assess the herd immunity in poultry and wild birds.

Key words: strain, influenza virus, haemagglutinin, neuraminidase, immune serum, phylogenetic analysis, wild bird, diagnosticus.

Введение. Известно, что среди диких птиц циркулируют как слабопатогенные варианты вируса гриппа А, так и высокопатогенные варианты, способные вызывать глобальные эпизоотии и пандемии среди населения [1]. Особого внимания заслуживает вирус гриппа А с гемагглютинином (НА) подтипа Н5. До недавнего времени этот вирус выделялся от диких птиц только спорадически. Однако в мае 2005 г. он стал причиной массовой эпизоотии и гибели более 6 тыс. диких птиц на оз. Цинхай в Китае. В дальнейшем с началом осеннего сезона миграции инфекция распространилась в некоторых странах Европы и Азии.

На территории Казахстана (Павлодарская обл.) в августе 2005 г. из органов погибших диких уток и домашних гусей были выделены высокопатогенные варианты вируса гриппа Н5Н1 [2]. В 2006 г. на побережье Восточного Каспия от погибшего лебедя-шипунa изолирован вирус гриппа с такой же антигенной формулой, который в РТГА проявил близкое родство с эталонным вирусом А/Вьетнам/2004 (Н5Н1) [3].

Изоляция вируса подтипа Н5Н1 свидетельствует о его циркуляции в орнитофауне и возможности возникновения в Республике Казахстан высокопатогенного для человека возбудителя гриппа. Циркуляция подобных вариантов в местах массовых скоплений мигрирующих птиц усиливает их эпизоотологический и эпидемиологический потенциал [4,5].

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения биологических, антигенных и молекулярно-генетических свойств нового казахстанского изолята вируса гриппа А/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09 (Н5Н3) с целью использования его при расшифровке этиологии эпидемических и эпизоотических вспышек гриппа.

Методы исследований. Для изоляции вирусов использовали трахеальные и клоакальные смывы от диких гусей. Выделение гемагглютинирующих агентов (ГАА) и клонирование их методом предельных разведений проводили на 10-11 дневных куриных эмбрионах (КЭ). Для первичной идентификации ГАА применяли коммерческую тест-систему Directigen Flu A фирмы "Becton Dickinson" (Sparks, США) [6].

Определение подтипа НА изолятов проводили микрометодом в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием набора диагностических сывороток к вирусам гриппа А с различными сочетаниями поверхностных антигенов, предоставленных доктором М. Lipkind (Израиль) и референсной лабораторией ВОЗ по гриппу в Вейбридже (Англия). Для удаления неспецифических ингибиторов иммунные сыворотки обрабатывали рецептор-разрушающим энзимом (RDE) из неочищенного фильтра V. Cholerae (Denka Seiken Co., Ltd. Tokyo, Japan). К одной части неразведенной сыворотки добавляли 3 объема RDE. Смесь оставляли при температуре 37 °С в течение 18 ч, затем прогревали при температуре 56 °С в течение 30 мин. и добавляли 6 частей физиологического раствора для получения конечного разведения сыворотки 1:10.

Идентификацию подтипа нейраминидазы (NA) изолятов вируса гриппа проводили в реакции ингибции нейраминидазной активности (ПИНА) согласно рекомендации ВОЗ [7]. Для этого использовали набор моноспецифических диагностических сывороток к NA вирусов гриппа А подтипов N1-N9, любезно предоставленных доктором М. Lipkind (Израиль). Сыворотки предварительно разводили 1:10 в забуференном физиологическом растворе (рН 7,2) и прогревали при +56 °С в течение 30 мин.

Выделение вирусной РНК проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hidden) в соответствии с рекомендациями производителя из 140 мкл вирусосодержащей аллантаоисной жидкости [8].

ОТ-ПЦР осуществляли одновременно в одношаговой реакции с использованием AccessQuick RT-PCR System (Promega, Madison, WI) [9].

Для секвенирования ДНК использовали метод дидеоксисеквенирования по Сенгеру [10]. Амплификацию фрагментов ДНК меченых ddNTP проводили на термоциклере BioRad (Genetic Analyzer 3730x Applied Biosystems, США).

Для амплификации и мечения нитей ДНК использовали набор BigDye Ready Reaction kit v1.1., а также полученные ПЦР продукты (фрагменты кДНК) и набор праймеров, рекомендованный для секвенирования сегментов генома вирусов гриппа А [11]. В смесь вносили кДНК вируса (ПЦР продукт) - 3 мкл, праймеры (прямой или обратный) - 3,2 pmol, набор ReadyReaction kit v.1.1. или 3.1. - 8 мкл, воду - до 20 мкл.

Очистку ДНК от несвязавшихся красителей осуществляли с помощью CleanSeq Reagent по прилагаемым инструкциям. Секвенирование ДНК проводили на автоматическом 96-капиллярном секвенаторе Genetic Analyser 3730 xl, Applied Biosystems согласно инструкции. Выравнивание последовательностей нуклеотидов осуществляли с помощью программы Align X пакета Vector NTI в сравнении с последовательностями из международного банка данных (GenBank).

Филогенетический анализ и построение древ выполнены с помощью программ BioEdit и MEGA версии 4 [12] методом "присоединение соседей" с использованием последовательностей из GenBank.

Результаты и обсуждение. При вирусологическом исследовании биологических проб, собранных в октябре 2009 г. на территории Аршалинского района Акмолинской обл., от белолобого гуся выделен ГАА. Предварительная идентификация, проведенная с использованием коммерческой тест-системы Directigen Flu A фирмы Becton Dickinson (Sparks, США), позволила отнести его к вирусу гриппа А. Дальнейшую идентификацию нового изолята вируса проводили в РТГА и РИНА (табл. 1). Как видно, гемагглютинирующая активность казахстанского изолята от белолобого гуся в РТГА подавлялась иммунными сыворотками к А/краска/Ю. Африка/1/61 (H5N3) и А/утка/Гонконг/205/77 (H5N2) в титрах 1:1280 и 1:160 соответственно. С диагностическими сыворотка-

ми к вирусам с подтипами NA H1-H4 и H6-H16 получены отрицательные результаты.

В РИНА вирус гриппа А/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09 взаимодействовал с моноспецифической иммун-

Таблица 1

Идентификация подтипов гемагглютинина и нейраминидазы казахстанского изолята вируса гриппа А/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09

Иммунная сыворотка	Титр антител к изоляту А/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09 в	
	РТГА	РИНА
Поликлональная к вирусу А/к рачка/Ю.Африка/1/62 (H5N3)	1280*	–
Поликлональная к вирусу А/утка/Гонконг/205/77 (H5N2)	160	–
Моноспецифическая к NA N3	–	864**

Примечания: * , ** – титры антител в обратных величинах в разведениях сывороток к NA и NA соответственно; – реакции не ставили.

ной сывороткой к NA N3 и не реагировал с референсными сыворотками к остальным подтипам NA (N1- NA2 и N4- N9).

Таким образом, по результатам РТГА и РИНА, новый казахстанский изолят отнесен к вирусу гриппа А с антигенной формулой H5N3.

Биологические свойства. Вирус А/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09 (H5N3) активно репродуцируется в системе куриных эмбрионов при температуре 37 °С до инфекционного титра 7,50 lg ЭИД50/0,2 мл, агглютинирует эритроциты курицы, морской свинки, мыши, кошки, козы, барана, лошади и крупного рогатого скота, обладает термостабильным НА, резистентен к неспецифическим ингибиторам нативных и прогретых (+62 °С - 30 мин., +100 °С - 10 мин.) сывороток морской свинки и кролика. По скорости элюции с нативных куриных эритроцитов

исследуемый штамм относится к умеренно элюирующему варианту, так как полностью высвобождается с поверхности куриных эритроцитов через 150 мин. инкубации при +37 °С.

К выделенному штамму А/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09 (H5N3) получена кроличья иммунная сыворотка с титром в РТГА 1:640.

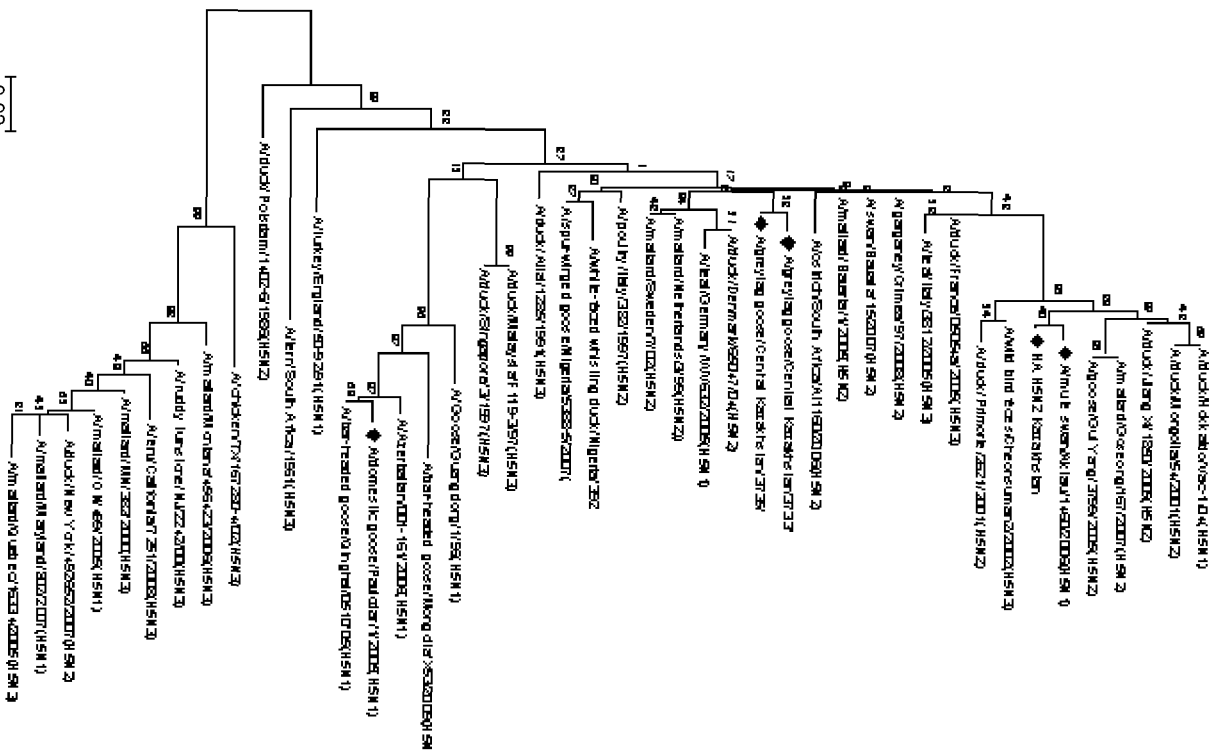
Характеристика сайта протеолитического нарезания HA. Установлено, что штаммы высокопатогенного вируса гриппа А/Н5 в сайте протеолитического нарезания HA содержат дополнительные вставки положительно заряженных аминокислот, таких, как аргинин (R), лизин (K), и характеризуются последовательностью -PQGERKKRGLFG-. Изолят А/белолобый гусь /Центральный Казахстан/3733/09 (H5N3), в отличие от изолятов А/лебедь шипун/Ақтау/1460/06 (H5N1) и А/огарь/Южный Казахстан/kz-0783/07 (H5N2), имеет лишь одну дополнительную вставку аргинина в сайте расщепления HA (PQGETRGLFG) (табл. 2), что характеризует его как низкопатогенный вариант вируса гриппа субтипа А/Н5.

Таблица 2

Сравнительная характеристика сайта протеолитического расщепления геммагглютинаина казахстанских изолятов вируса гриппа А/Н5

Изолят,	Сайт протеолитического нарезания HA
А/лебедь шипун/Ақтау/1460/2006 (H5N1)	P Q R E T - - - - G L F G
А/огарь/Южный Казахстан/783/07 (H5N2)	P Q R E T - - - - G L F G
А/белолобый гусь /Центральный Казахстан/3733/09 (H5N3)	P Q R E T R - - - - G L F G

Генетическая характеристика вируса. Проведено секвенирование нуклеотидной последовательности гена HA вируса А/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09 (H5N3). Результаты сравнительного анализа 799 нуклеотидов гена HA вируса со штаммами из GenBank (рисунок), показывают, что казахстанский изолят отличается от эталонного варианта А/крачка/



Филогенетические взаимоотношения между генами HA казахстанского изолята вируса гриппа А/Н5 и генами этого подтипа из GenBank

Ю. Африка/1/72 (H5N3) и филогенетически близок с более ранними западноевропейскими штаммами A/duck/Denmark/65047/04 (H5N2), A/teal/Germany/WV632/05 (H5N1), A/mallard/Netherlands/3/99 (H5N2), A/mallard/Sweden/7/2002 (H5N2) с которыми образует отдельный кластер.

Выводы

Результаты изучения биологических и молекулярно-генетических свойств указывают на то, что выделенный нами вирус А/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09 (H5N3) отличается от эталонных и ранее выделенных штаммов вируса гриппа А/Н5, и является новым природным вариантом. Соответствие сайта протеолитического нарезания НА с аналогичным сайтом слабопатогенных вариантов позволяет рекомендовать его как безопасного антигена в практических вирусологических лабораториях при расшифровке этиологии эпидемических и эпизоотических вспышек гриппа, а также для оценки напряженности популяционного иммунитета у домашних и диких птиц. Своевременное слежение за вирусом гриппа в орнитофауне играет важную роль в раннем распознавании угрозы пандемии и подготовке к ней.

Новый штамм депонирован в коллекции микроорганизмов РГП НИИ проблем биологической безопасности КН МОН РК (депозит М-09-10/Д) и защищен патентом РК (№25035 от 15.12.2013).

Литература

1 *Ellis T.M., Bousfield R.B., Bissett L.A. et al.* Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002 // *Avian Pathol.* – 2004. – № 33. – P. 492-505.

2 *Mamadaliyev S.M., Koshemetov Z.K., Matveyeva V.M.* Avian influenza virus H5N1 subtype A diagnosed in sick and dead wild and domestic birds in Pavlodar oblast, Republic of Kazakhstan // *African Journal of Agricultural research.* – August, 2007. – Vol. 2. – P. 360-365.

3 Кыдырманов А.И., Саятов М.Х., Асанова С.Е. и др. Слежение за циркуляцией вируса гриппа А среди мигрирующих птиц Северного и Восточного Каспия в 2002-2007 гг.: матер Междунар. науч.-практ. конф. // Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития. – Алматы, 2008. – С. 535-538.

4 Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T. et al. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-179.

5 Саятов М.Х., Кыдырманов А.И., Ишмухаметова Н.Г. Высокпатогенный грипп птиц, ситуация в мире и Казахстане // Биотехнология. Теория и практика. – 2006. – № 2. – С. 5-13.

6 Harper S., Klimov A., Uyeki T., Fukuda K. *Influenza // Clin Lab Med.* - 2002. – Vol. 22. – P. 863-882.

7 Douwdal W.A., Kendal A., Noble G.R. *Influenza virus // Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection.* – Washington, 1979. – P. 585-609.

8 QIAamp Viral RNA Vini Handbook 12/ 2005.

9 Payungporn S., Phakdeewirot P., Chutinimitkul S. et al. Single-Step Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Influenza A Virus Subtype H5N1 Detection // *Viral Immunology.* – 2004. – Vol. 17. – P. 588-593.

10 Sanger F., Nicklen S., Goulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *PNAS.* – 1977. – Vol.74. – P. 5463-5467.

11 Hoffman E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses // *Arch Virol.* – 2001. – Vol.146. – P. 2275-2289.

12 Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // *Mol. Biol. Evol.* – 2007. – Vol. 24. – P. 1596-1599.