

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

Институт микробиологии и вирусологии,
г. Алматы, Казахстан

НОВЫЙ ШТАММ ВИРУСА ГРИППА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА А/Н1 ДИКИХ И ДОМАШНИХ ПТИЦ

В статье представлены результаты антигенного и филогенетического анализа вируса гриппа А(Н1N2), изолированного в 2010 г. от нырковой утки (красноносые нырки - *Netta rufina*) на юго-восточном побережье оз. Балхаш. Показано, что по гену гемагглютинина (НА) балхашский изолят А(Н1N2) относится к евразийской птичьей линии и отличается от эталонных и каспийских вариантов этого подтипа уникальными аминокислотными заменами. Приготовленные на основе оригинального казахстанского вируса гриппа А/красноносый нырок/Балхаш/4523/2010 (Н1N2) диагностические препараты (антигены, иммунные сыворотки) могут быть использованы в вирусологических лабораториях при расшифровке этиологии эпизоотических вспышек гриппа, а также для оценки напряженности популяционного иммунитета у диких и домашних птиц.

Ключевые слова: вирус гриппа, Н1N2, гемагглютинин, нейраминидаза, иммунная сыворотка, диагностикум дикая птица.



Мақалада 2010 жылы Балқаш к. Оңтүстік-Шығыс жағалауында сүңгуір үйректерден (қызылтұмсық сүңгуір - *Netta rufina*) бөлініп алынған А(Н1N2) тұмау вирусының антигендік және филогенетикалық талдау нәтижелері келтірілген. Балқаштық А(Н1N2) бөліндісі гемагглютинин (НА) гені бойынша осы тұрастындағы эталондық және каспийлік нұсқаларынан өзгеше аминқышқылдық алмасуларымен ерекшеленіп, еуразиялық құс линиясына жататыны анықталды. Қазақстандық А/қызылтұмсық сүңгуір/Балқаш/4523/10 (Н1N2) штамының түпнұсқасы негізінде дайындалған балаулық препараттар (антигендер, иммундық сарысулар) вирусологиялық зертханаларда тұмау вирусының эпизоотиясының этиологиясын анықтауда, сонымен қатар үй және жабайы құстардың популяциялық иммунитетінің дережесін бағалауда қолдануға болады.

Түйінді сөздер: тұмау вирусы, H1N2, гемагглютинин, нейраминидаза, иммундық сарысу қан сары суы, диагностикум, жабайы құс.



The article presents the results of antigenic and phylogenetic analysis of influenza A virus (H1N2), isolated in 2010 from the diving ducks (Red-crested Pochard - *Netta rufina*) on the southeastern shore of Lake Balkhash. It is shown that the hemagglutinin gene (HA) (ON) Balkhash isolate A (N1N2) refers to the Eurasian avian line and differs from the standard and Caspian versions of this subtype by unique amino acid substitutions. Prepared on the basis of the original Kazakh Influenza A-virus / the red-nosed nyrok/ Balhash/4523/2010 (H1N2) diagnostic agents (antigens, immune serum) can be used in virology laboratories in deciphering of the etiology of epizootic outbreaks, as well as, to assess the herd immunity in wild and poultry.

Key words: influenza virus , H1N2, the hemagglutinin , neuraminidase antisera, antiserum diagnostic wild bird .

Введение. Вирусы гриппа А с НА Н1 характеризуются широким кругом восприимчивых видов (человек, птицы, млекопитающие животные), что обуславливает возможность преодоления ими межвидового барьера и трансмиссии к другим хозяевам [1,2]. Пандемия гриппа 2009 г., вызванная свиным вирусом А(Н1N1), наглядно продемонстрировала тяжелые экономические последствия вовлечения человека в круг хозяев вируса.

В Казахстане вирусы гриппа А(Н1N1), в антигенном отношении сходные с эпидемическими вариантами 1950-1952 гг. и 1977-1978 гг., выделены в 1979-1980 гг. от озерных и серебристых чаек, чирков-трескунков, лысух, юрков, широконосок и ворон [3].

В работе приводятся результаты изучения биологических, антигенных и молекулярно-генетических свойств нового казахстанского изолята вируса гриппа А/красноносый нырок/Балхаш/4523/10 (H1N2) с целью расшифровки этиологии эпизоотических вспышек гриппа и для оценки напряженности популяционного иммунитета у диких и домашних птиц.

Методы исследований. Проведены исследования клоакальных и трахеальных смывов от диких уток. Изоляцию вируса и их клонирования проводили методом предельных разведений на 10-11-дневных куриных эмбрионах (КЭ) по общепринятому методу. Для установления принадлежности гемагглютинирующего

агента (ГАА) к вирусам гриппа А использовали коммерческую тест-систему Directigen Flu A (Becton Dickinson, США), а также полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с праймером к М гену вируса гриппа А.

Антигенную формулу изолята вируса гриппа А определяли в реакциях торможения гемагглютинации (РТГА) и ингибиции нейраминидазной активности (РИНА) с использованием наборов поликлональных и моноспецифических диагностических сывороток к 16 подтипам HA и 9 подтипам NA, согласно рекомендациям ВОЗ [4]. Выделение вирусной РНК проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hidden), в соответствии с рекомендациями производителя из 140 мкл вирусосодержащей аллантаической жидкости [5]. Обратную транскрипцию с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) проводили с ревертазой AMV reverse transcriptase (Promega, Madison) при помощи праймера Uni 12 (agcaaaagcagg). Амплификацию кДНК осуществляли с использованием праймеров, рекомендованных для секвенирования сегментов генома вирусов гриппа А [6] и набора the Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Германия) согласно приложенному протоколу.

Для секвенирования кДНК использовали метод дидеоксисеквенирования, по Сенгеру [7]. Секвенирование ДНК проводили на автоматическом 96-капиллярном секвенаторе Genetic Analyser 3730 xl, Applied Biosystems согласно инструкции. Для обозначения кластеров применена система, описанная Lui et al. [8].

Выравнивание секвенированных последовательностей генов вирусов гриппа А с полными нуклеотидными последовательностями таковых вирусов американской и евразийской линий проводили по компьютерной программе BioEdit. Филогенетический анализ и построение древ выполнены с помощью программы BioEdit и MEGA версии 4 методом "присоединения соседей" с использованием последовательностей из GenBank [7].

Результаты и обсуждение. При вирусологическом исследовании биологических проб, собранных в октябре 2010 г. от нырковых уток (красноносые нырки - *Netta rufina*) на юго-восточном

побережье оз. Балхаш, выделен ГАА [9]. Предварительная диагностика, проведенная при помощи коммерческой тест-системы Directigen Flu A, позволила отнести его к вирусу гриппа рода А. Дальнейшую идентификацию нового изолята проводили в РТГА и РИНА. Судя по данным таблицы, ГАА казахстанского изолята от красносного нырка в РТГА подавлялась иммунной сывороткой к А/гусь/Гонконг/8/1976 (H1N1) в титре 1:2560. С диагностическими сыворотками к вирусам гриппа с подтипами гемагглютининов H2-H16 получены отрицательные результаты.

Идентификация подтипа гемагглютинина и нейраминидазы казахстанского изолята вируса гриппа А/красноносый нырок/Балхаш/4523/10

Иммунная сыворотка	Титр антител к вирусу в	
	РТГА	РИНА
Поликлональная к вирусу А/гусь/Гонконг/8/1976 (H1N1)	2560*	–
Моноспецифическая к NA N2	–	100**

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

Ферментативная активность изолята А/красноносый нырок/Балхаш/4523/10 (H1N2) в РИНА ингибировалась моноспецифической иммунной сывороткой к NA N2 и не подавлялась референсными сыворотками к остальным подтипам NA (N1, N3-N9).

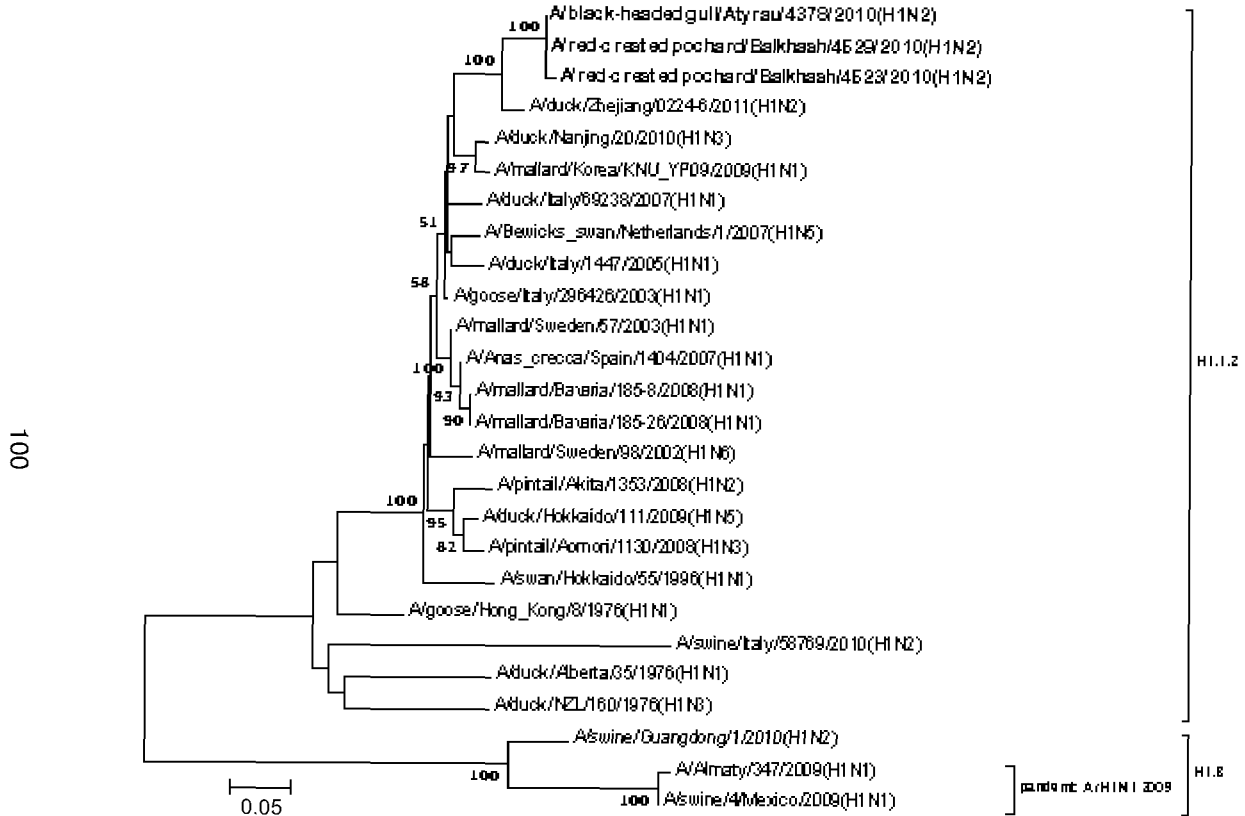
Таким образом, по результатам РТГА и РИНА, новый казахстанский изолят отнесен к вирусу гриппа А с антигенной формулой H1N2.

Биологические свойства. Изолят А/красноносый нырок/Балхаш/4523/10 (H1N2) активно репродуцируется в системе куриных эмбрионов при температуре 37 °С до инфекционного титра 6,8 lg ЭИД₅₀/0,2 мл., в титрах 1:128 - 1:512, агглютинирует эритроциты курицы, морской свинки, кошки, лошади, барана, крупного рогатого скота и человека "0" группы, обладает термостабильным HA и ингибитороустойчивостью по отношению к неспецифическим пртивовирусным субстанция сывороток крови мор-

ской свинки, и лошади. По скорости элюции с нативных куриных эритроцитов исследуемый вирус относится к умеренно-элюирующему варианту, так как полностью высвобождается с поверхности куриных эритроцитов через 180 мин. инкубации при 37 °С. К выделенному штамму А/красноносый нырок/Балхаш/4523/10 (H1N2) получена кроличья иммунная сыворотка с титром в РТГА 1:1280.

Генетическая характеристика вируса. Проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей гена НА изолятов вируса гриппа H1, выделенных в 2010 г. от диких птиц в различных регионах Казахстана, и сравнение их с таковыми штаммов из международного банка данных GenBank. Результаты, представленные на рисунке, показывают, что казахстанский вирус А/красноносый нырок/Балхаш/4523/10, так же как и изоляты А/озерная чайка/Атырау/4378/10 и А/красноносый нырок/Балхаш/4529/10, входит в кластер H1.1.2, образуемый в основном птичьими вирусами евразийской линии, отличается от эталонного варианта А/гусь/Гонконг/8/76 (H1N1). По гену НА вирус А/красноносый нырок/Балхаш/4523/10 формирует монофилетическую группу, ответвляющуюся от штаммов, циркулировавших в 2009-2011 гг. в Китае и Корее, которые восходят к европейским изолятам пластинчатоклювых 2002-2008 гг. и отдаляются от японских штаммов 2008-2009 гг. Наиболее близким к вирусу А/красноносый нырок/Балхаш/4523/10 был изолят А/duck/Zhejiang/0224-06/2011 (H1N2). Возможно, вариант, подобный этому вирусу, явился донором для НА и NA генов казахстанского изолята H1N2. Из рисунка видно, что ген НА А/красноносый нырок/Балхаш/4523/10 (H1N2) филогенетически не связан с пандемическим штаммом "свиного гриппа" А/Алматы/347/2009 (H1N1) и свинными вирусом А/swine/Guandong/1/2010 (H1N2), которые представляют отдельную линию генетического кластера H1.3.

По гену НА изоляты А/озерная чайка/Атырау/4378/2010 и А/красноносый нырок/Балхаш/4529/2010, выделенные в разных регионах, оказались полностью идентичными между собой и отличались от изолята А/красноносый нырок/Балхаш/4523/2010 лишь на один нуклеотид в результате транзиции А G, что приве-



Филогенетические взаимоотношения между генами HA казахстанского изорлята вируса гриппа А/Н1 и генами этого подтипа из GenBank

ло к несинонимичной замене кодируемой аминокислоты в положении 39 с Lys на Arg. В отличие от остальных сравниваемых вирусов HA казахстанского изолята А/красноносый нырок/Балхаш/4523/2010 (H1N2) обладает уникальными аминокислотными заменами: Ala15 Ile, Thr44 Ser, Thr99 Asn.

Выводы

Впервые в Казахстане от нырковых уток в Иле-Балхашском регионе выделен вирус гриппа с антигенной формулой H1N2. Результаты сравнительного филогенетического анализа указывают на то, что вирус гриппа А/красноносый нырок/Балхаш/4523/10 (H1N2) является новым природным изолятом, отличающимся от эталонного штамма А/гусь/Гонконг/8/1976 (H1N2) и других вирусов этого подтипа наличием уникальных аминокислотных замен: Ala15 Ile, Thr44 Ser, Thr99 Asn.

Приготовленные на основе оригинального казахстанского штамма А/красноносый нырок/Балхаш/4523/2010 (H1N2) диагностические препараты (антигены, иммунные сыворотки, тест-системы) могут быть использованы в вирусологических лабораториях при расшифровке этиологии эпизоотических вспышек гриппа, а также для оценки напряженности популяционного иммунитета у диких и домашних птиц.

Новый штамм депонирован в коллекции микроорганизмов РГП на праве хозяйственного ведения "НИИ проблем биологической безопасности" КН МОН РК (депозит № М-3-13/Д) и защищен патентом РК (№81196 от 04.05.2013).

Литература

1 Львов Д.К., Ямникова С.С., Федякина И.Т. и др. Экология и эволюция вирусов гриппа в России (1979-2002 гг.) // Вопросы вирусологии. – 2004. – № 3. – С. 17-24.

2 Fouchier R.M., Munster V., Wallensten A. et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype

(H16) obtained from black-headed gulls // *J Virol.* – 2005. – Vol.79, – № 5. – P. 2814-2822.

3 *Саятов М.Х.* Экология и иммунология вирусов гриппа А(H1N1), циркулирующих среди диких птиц и населения Казахской ССР: автореф. дис. докт. биол. наук, 1986. – 45 с.

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

5 QIAampR Viral RNA Mini Handbook 12, 2005.

6 *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.

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

8 *Liu S., Ji K., Chen J. et al.* Panorama phylogenetic diversity and distribution of type A influenza virus. *PLoS ONE* 2009; 4:e5022.

9 *Кыдырманов А.И., Саятов М.Х., Карамендин К.О. и др.* Филогенетическая характеристика казахстанских изолятов вируса гриппа диких птиц H1N2: матер. Междунар. науч.-практ. конф. // Актуальные пробл. вирусол., микробиол. гигиены, эпидемиол. и иммунобиол.: к 100-летию акад. АН КАЗ ССР, д.м.н., проф. Х. Ж. Жуматова. – Алматы, 2012. – С. 56-61.