

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 34.25.37

*Н.С. Онгарбаева^{1,2}, Н.Г. Кливлеева¹, Т.И. Глебова¹, Н.Т. Сактаганов¹,
Б.Б. Баймаханова¹, А.М. Баймухаметова¹, Г.В. Лукманова¹,
М.Г. Шаменова¹, И.С. Коротецкий³*

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии,
г. Алматы, Казахстан

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
г. Алматы, Казахстан

³Научный центр противоинфекционных препаратов,
г. Алматы, Казахстан

НОВЫЙ ШТАММ ВИРУСА ГРИППА H1N1 А/СВИНЬЯ/КОСТАНАЙ/23/14, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Аннотация. В статье представлены результаты изучения биологических и антигенных свойств нового штамма вируса гриппа H1N1 А/свинья/Костанай/23/14, который отличается от эталонных вариантов этого подтипа. Результаты изучения биологических, антигенных и молекулярных свойств нового штамма вируса гриппа А/свинья/Костанай/23/14 свидетельствуют о возможности использования его в качестве диагностикума с целью выявления специфических антител в сыворотках крови свиней, инфицированных современным вариантом вируса гриппа А подтипа Н1 и для проведения фундаментальных молекулярно-биологических исследований.

Ключевые слова: вирус гриппа, изолят, гемагглютинин, нейраминидаза.

• • •

Түйіндеме. Мақалада эталонды нұсқаулардан ерекше, жаңадан белініп алынған А/шошқа/Қостанай/23/14 H1N1 тұмау вирусы штаммының биологиялық және антигендік құрамын зерттеу нәтижелері керсетілген. Жаңадан белініп алынған А/шошқа/Қостанай/23/14 тұмау вирус штаммының биологиялық және антигендік құрамын зерттеу нәтижелері, шошқалардың қан сарысуынан жаңа А тұмау вирусының Н1 түрінің спецификалық антиденелерін анықтау мақсатында диагностикум ретінде пайдалануға болатындығын керсетеді, сонымен қоса іргелі молекулярлы-биологиялық зерттеулерге пайдаланылады.

Түйінді сөздер: тұмау вирусы, изолят, гемагглютинин, нейраминидаза.

Источник финансирования исследований. Работа выполнена в рамках государственного гранта Комитета Науки Министерства Образования и Науки Республики Казахстан № АР05130989: «Молекулярно-генетическая изменчивость вирусов гриппа свиней в Казахстане».

Abstract. The results of studying set forth biological and molecular genetic properties of a new influenza virus H1N1 A/ swine /Kostanay/23/14strain differing from the reference variants of this subtype. Studies on biological and antigenic properties of a new influenza virus A/swine /Kostanay/23/14(H1N1) strain indicate the possibility of using it as a diagnosticum for the purpose of identifying specific antibodies in the sera of swine infected with current variant of influenza A virus subtype H1 as well as for carrying out fundamental molecular biological studies.

Keywords: influenza virus, isolate, hemagglutinin, neuraminidase.

Введение. Известны референсные варианты вируса гриппа свиней A/swine/lowa/15/30 (H1N1) и A/swine/USA/1976/31, которые циркулировали среди поросят с признаками поражения респираторных органов [1,2]. В 1949 г. Т. Francis et. al. [3] от больных свиней в Корее выделили штамм «Ottie» по антигенным характеристикам идентичный вирусу A/FM/1/47 (H1N1). Вирусы с аналогичной формулой поверхностных антигенов затем изолированы в Румынии, Венгрии и СССР.

Классические A/H1N1 вирусы свиней (впервые обнаруженные в Китае в 1974 г., но, вероятно, существующие в течение многих десятилетий раньше) являются энзоотическими в Китае и совместно циркулируют с A/H1N2 вирусами, где N2 имеет человеческое происхождение [4]. С 1979 г. у свиней выделяют антигенно отличающийся вариант A/H1N1 птичьего происхождения. Вирус подтипа A/H1N1 является наиболее распространенным, антитела к нему обнаруживают у свиней по всему миру. В 1993 г. поступило сообщение о выделении птичьего варианта A/H1N1 у свиней в Китае. Однако, они не были потомками евразийских птицеподобных A/H1N1 вирусов и, вероятно, осуществили независимый межвидовой перенос из азиатского птичьего резервуара в свиней [5].

Подтип A/H3N2 был впервые выявлен у свиней в 1970 г., он считается результатом межвидового перехода вируса гриппа от человека к свиньям. Вирусы человека A/H3N2 долго циркулировали среди свиней после того, как родоначальный вирус человека был заменен в человеческой популяции. В 1999 г. и 2001 г. в Китае впервые были обнаружены европейские вирусы A/H3N2 и A/H1N1, в 2002 г. выявлены североамериканские тройные реассортанты вирусов, что указывает на межконтинентальное передвижение вирусов свиней [6]. Социркуляция различных линий вирусов гриппа А свиней была связана с появлением реассортантов между каждой новой потомственной ли-

нии. Недавно также были обнаружены у свиней вирус A/H1N1pdm09 и его реассортанты. Хотя большая часть таких фактов наблюдалась на бойнях в Китае, свинину импортируют во многие страны, поэтому эти данные, вероятно, описывают экологию свиного гриппа в более широком регионе. Кроме того, в Азии спорадически у свиней обнаруживали птичьи вирусы гриппа с антигенными формулами A/H9N2, A/H5N1, A/H4N8 и A/H6N6 [7].

В начале 90-х годов появились сообщения об изоляции штаммов вируса гриппа A/H1N2 от свиней в Японии [8], Казахстане [9], Франции [10], Бельгии [11], Индии [12], США [13], что свидетельствует о повсеместном появлении реассортантов вирусов гриппа свиней, человека и птиц с антигенными формулами A/H1N1 и A/H3N2 в организме свиней [14,15]. Эпизоотии гриппа среди свиней представляют серьезную проблему в Республике Казахстан. Так, в 1984 г. в результате вирусологического обследования поросят с признаками респираторных заболеваний в свиноводческих хозяйствах Восточного Казахстана изолировано три штамма вируса гриппа A/H1N1 [9], в 2008-2009 гг. в крестьянских хозяйствах республики от свиней разных возрастов выделено девять изолятов, из которых четыре имели антигенную формулу A/H1N1, один – A/Hsw1N1 и четыре – A/H3N2. Серологический анализ, проведенный для ретроспективного подтверждения этиологической роли вирусов гриппа, показал наличие у животных антител к вирусам гриппа A/H1N1; A/Hsw1N1 и A/H3N2 [16,17].

Методы исследования. Носоглоточные смывы от животных собирали во флаконы с 2 мл среды 199 с 0,5% бычьим сывороточным альбумином и комплексом антибиотиков (пенициллин 50 000 ед/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, гентамицин 3000 мкг/мл, нистатин 5000 ед/мл). Пробы выдерживали в течение суток при 4°C и хранили в жидком азоте. Первичный скрининг биологических проб осуществляли в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) на амплификаторе RoterGen 6000 (CorbettResearch, Австралия) с применением наборов «РИБО - преб», «АмплиСенс® Influenzavirus A/B-FL» и «АмплиСенс® Influenzavirus A-типа FL» (Россия, г. Москва) [18]. Изоляцию вирусов проводили в двух системах традиционными методами: на культуре клеток MDCK с добавлением ТРСК-трипсина (2 мкг/мл) и в 9-11 дневных куриных эмбрионах (КЭ). Для индикации вируса в реакции гемагглютинации использовали 0,75% взвесь эритроцитов петуха и человека I (0) группы крови [19].

Инфекционную активность изолятов определяли по общепринятому методу [20] и их титр выражали в Ig ЭИД50/0.2 мл. Идентификацию вирусов проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции ингибиции нейраминидазной активности (РИНА) с наборами поликлональных диагностических сывороток ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов» (Россия, г. Санкт-Петербург), согласно рекомендациям ВОЗ [20,21]. Вирусосодержащую аллантоисную жидкость осветляли центрифугированием при 5000 об/мин. в течение 10 мин. при 4°C. Затем вирус концентрировали при 29 000 об/мин. в течение 180 мин. при 4°C на центрифуге Beckman Coulter Optima TmL-90K Ultracentrifuge. Полученный осадок вируса ресуспендировали в минимальном объеме буфера, после чего определяли гемагглютинирующую активность. Изучение антигенных взаимосвязей проводили в перекрестной реакции торможения гемагглютинации (РТГА) по методике рекомендованной ВОЗ [22] с иммунными сыворотками, полученными путем 2-х кратной иммунизации кроликов очищенными и концентрированными вирусными материалами [23].

Выделение РНК проводили с использованием набора реагентов Pure Link Genomic DNA Kits согласно инструкции производителя (Invitrogen, США). Секвенирование образцов вируса гриппа выполняли на секвенаторе Ion Torrent PGM (США). РНК библиотеку проводили без предварительного получения кДНК, ферментативным методом с применением Ion total RNA-seq kit V2 набора. Степень и качество фрагментирования библиотеки оценивали с использованием капиллярного электрофореза Bioanalyzer 2100 (Agilent). Баркодирование изолятов осуществляли с использованием набора Ion Xpress™ RNA-Seq Barcode 1-16 Kit. Секвенирование полученной библиотеки проводили на 318 чипе, используя Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit. Все операции выполняли согласно протоколам разработчиков. Качество полученных ридов определяли с помощью программы FastQC и выравнивали, используя программу Bowtie2, имплементированную в пакете программ UGENE v.1.32.0. Филогенетические деревья выполнены с помощью программы Tree Viewer version 1.17.5, имплементированной в базе данных NCBI.

Результаты и обсуждение. При вирусологическом исследовании биологических проб, собранных от свиней в крестьянском хозяй-

стве Костанайской области в 2014 г., изолирован гемагглютинирующий агент. Первичный скрининг изолята в РТ-ПЦР позволил отнести его к вирусу гриппа А/Н1N1. В результате первичного заражения КЭ и культуры клеток MDCK и проведения последующих пассажей выделен изолят А/свинья/Костанай/23/14. Идентификацию вируса проводили в РТГА и РИНА с использованием наборов диагностических сывороток.

Результаты идентификации поверхностных белков в РТГА представлены в таблице 1. Как видно из таблицы 1 гемагглютинирующая активность изолята в титре 1:1280 подавлялась иммунными сыворотками А/USA/1976/31 (Н1N1) с антигенной формулой А/Н1N1, что позволило отнести его к вирусу гриппа А с подтипом НА Н1. С иммунной сывороткой к вирусу гриппа с подтипом гемагглютинина Н3 получены отрицательные результаты.

Таблица 1 - Идентификация подтипа гемагглютинина казахстанского изолята вируса гриппа А/свинья/Костанай/23/14

Иммунная сыворотка к референсному штамму:	Гомологичный титр:	Титр антител к изоляту А/свинья/Костанай/23/14:
А/USA/1976/31 (Н1N1)	1280	160
А/California/04/09 (Н1N1) pdm	640	40
А/Perth/16/09 (Н3N2)	640	<20
А/Wisconsin/67/05 (Н3N2)	640	<20
А/Panama/2007/99 (Н3N2)	640	<20

Примечание - даны обратные величины титров специфических антигемагглютининов

В РИНА ферментативная активность изолята подавлялась иммунной сывороткой к нейраминидазе N1. Полученные результаты позволили идентифицировать казахстанский изолят А/свинья/Костанай/23/14 как вирус гриппа А с антигенной формулой Н1N1 (таблица 2).

Таблица 2 – Идентификация подтипа нейраминидазы казахстанского изолята вируса гриппа А/свинья/Костанай/23/14

Подтип нейраминидазы	Титр антител
N1	100
N2	<20

Примечание - даны обратные величины титров специфических антинейраминидазных антител

Биологические свойства. Штамм А/свинья/Костанай/23/14 (H1N1) активно репродуцируется в системе КЭ при оптимальной (37 °С) температуре. На КЭ инфекционный титр составил 4,23 lg ЭИД_{50/0,2 мл} титр гемагглютинации - 1:512. Исследуемый штамм активно агглютинирует эритроциты курицы, утки, барана, морской свинки и человека. Предлагаемый штамм обладает термостабильным НА, поскольку сохранял способность вызывать агглютинацию эритроцитов курицы после прогревания при 56°С в течение 60 мин. Штамм А/свинья/Костанай/23/14 (H1N1) оказался резистентным 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 элюировал через 60 мин. инкубации при 37°С. К выделенному штамму А/свинья/Костанай/23/14(H1N1) получена кроличья иммунная сыворотка с титром в РТГА 1:2560.

Антигенные взаимосвязи. В таблице 3 представлены результаты анализа антигенной структуры казахстанского изолята и эталонных штаммов вируса гриппа в перекрестной РТГА. Как видно из таблицы 3, вирус А/свинья/Костанай/23/14 взаимодействовал с антисыворотками к эталонам А/Swine/lowa/15/30 (Hsw1N1), А/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1) и А/New Jersey/8/76 (H1N1) в титрах 1:640 (1/4 гомологичного титра). С иммунной сывороткой А/California/04/09 pdm (H1N1) – в более низких титрах 1:80 (1/32 гомологичного титра). Референсный вирус А/Swine/lowa/15/30 (H1N1) и А/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1) ингибировался сывороткой к казахстанскому изоляту в 1/2 гомологичного титра (1:1280), тогда как эталонные штаммы А/New Jersey/8/76 (H1N1) подавлялись сывороткой к вирусу А/свинья/Костанай/23/14 (H1N1) в гомологичных титрах (1:640), пандемический вирус А/California/04/09 pdm - в 1/64 гомологичного титра (1:40). Установлено, что прямые титры казахстанского изолята А/свинья/Костанай/23/14 по отношению к референсным штаммам А/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1), А/Swine/lowa/15/30 и А/New Jersey/8/76 (H1N1) существенно не отличались от обратных и составляли от 1/4 до гомологичного титра. Для вируса А/California/04/09 pdm эти показатели составляли 1/32– 1/64 гомологичного титра.

Таким образом результаты изучения антигенных взаимосвязей указывают на близкое родство штамма А/Костанай/23/14 (H1N1) с классическими вирусами гриппа свиней А/swine/lowa/15/30 и А/swine/USA/1976/31, а также с «swine-like» вариантом вируса гриппа

человека A/New Jersey/8/76 (H1N1). Молекулярно-биологические свойства. Для определения степени генетического родства казахстанского изолята вируса гриппа свиней A/свинья/Костанай/23/14 (H1N1) с референсными вирусами из международной базы данных проведено секвенирование продуктов ПЦР. Установлены последовательности генов HA и NA. Филогенетические деревья генов HA и NA в сравнении со штаммами, представленными в международной базе данных NCBI, строили с использованием метода Neighbor-Joining (рисунки 1 и 2).

Таблица 3 – Результаты перекрестной РТГА казахстанского штамма вируса гриппа A/свинья/Костанай/23/14

Штамм	Иммунная сыворотка				
	A/свинья/ Костанай/ 23/14	A/Swine/ Iowa/15/30 (Hsw1N1)	A/swine/ USA/1976/ 31 (Hsw1N1)	A/New Jersey/8/76 (H1N1)	A/California/ 04/09 pdm (H1N1)
A/свинья/ Костанай/ 23/14	2560	640	640	640	80
A/Swine/ Iowa/15/30 (Hsw1N1)	1280	640	640	320	40
A/swine/ USA/1976/31 (Hsw1N1)	1280	320	640	640	80
A/New Jersey/8/76 (H1N1)	640	160	640	640	40
A/California/ 04/09 pdm (H1N1)	40	80	80	40	640

Примечание - приведены обратные величины титров антигемагглютининов

Результаты Blast-анализа последовательностей нуклеотидов участка генов HA и NA в сравнении со штаммами из международной базы данных показали, что вирус гриппа A/свинья/Костанай/23/14(H1N1) имеет наибольшую степень сходства со штаммами H1N1 (A/swine/Guangdong/L3/2009, A/swine/Changhua/199-3/2000, A/swine/Jamesburg/1942), выделенными от свиней в Китае и США в разные годы классическими свинными вирусами (A/swine/USA/1976-MA/1931, A/swine/Iowa/15/30). По гену HA вирус показал близкое родство с вирусом A/AlmaAta/1417/84 (H1N1), выделенным в Казахстане от больного человека, имевшего контакт со свиньями. Это позволяет отнести изолят к кластеру, образованному свинными вирусами.

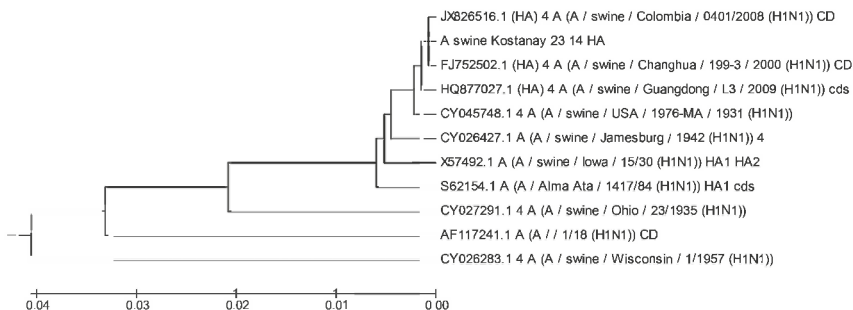


Рисунок 1 - Филогенетическое древо по гену HA для изолята A/свинья/Костанай/23/14 (H1N1)

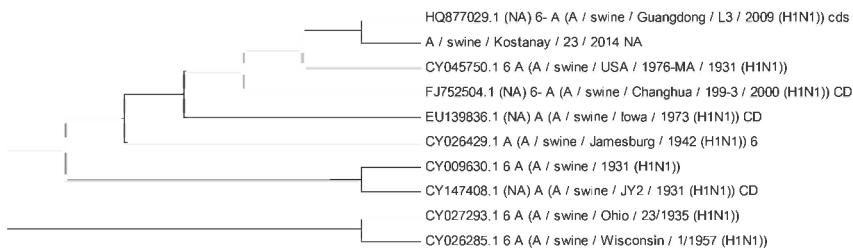


Рисунок 2 - Филогенетическое древо по гену NA для изолята A/свинья/Костанай/23/14 (H1N1)

Приготовленные на его основе диагностические препараты могут быть использованы в вирусологических лабораториях при расшифровке этиологии эпидемических вспышек гриппа.

Выводы.

1. При вирусологическом исследовании биологических проб, собранных от свиней в крестьянском хозяйстве Костанайской области в 2014 г., выделен гемагглютинирующий агент, который в РТ-ПЦР, РТГА и РИНА идентифицирован как вирус гриппа А (H1N1) A/Костанай/23/14.

2. Вирус обладает термостабильным HA, относится к умеренно элюирующему варианту, агглютинирует эритроциты человека и различных видов животных и проявляет резистентность к неспецифическим ингибиторам нативных и прогретых сывороток морской свинки и кролика.

3. Изоляция вируса гриппа A/Костанай/23/14(H1N1), по антигенной характеристике родственного с эталонами A/swine/lowa/15/30 и

A/swine/USA/1976/31, свидетельствует о потенциальной возможности циркуляции в РК эпидемически значимого свиного варианта вируса гриппа.

Новый штамм депонирован в коллекции микроорганизмов «РГП НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК (депозит М-15-17/D от 31.07.2017).

Список литературы

- 1 *Easterday B.C.* //Diseases of Swine.New York. 1970. P.127-157.
- 2 *Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Webster RG.* Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus // J Virol. – 1990. – 64(4) – P. 1487-97.
- 3 *Горбунова А.С., Пысина Т.В.* //В кн.: «Грипп животных». М. - 1973. – с. 232.
- 4 *Shortridge K.F., Webster R.G., Butterfield W.K. and Campbell C.H.* // Persistence of Hong Kong influenza virus variants in pigs. Science 196.- 1977. - P. 1454-1455.
- 5 *Peiris J.S., Guan M.Y., Ghose P. et.al.* // H3N2, H9N2 and H1N1 subtype influenza viruses cocirculate in pigs in southeastern China. In: Osterhaus A.D., Cox M.E. and Hampson A.W. Options for the Control of Influenza IV. 2001. - 195-200. - Excerpt Medica, International congress Series 1219. - Amsterdam.
- 6 *Vijaykrishna D., Smith G.J. Pybus O.G et. al.* // long-tem evolution and transmission dynamics of swine influenza A virus. Nature 473.- 2011. - P. 519-522.
- 7 *Trevennec K., Cowling B.J., Peyre M. et. al.* // Swine influenza surveillance in East and Southeast Asia: a systematic review. Anim. Health Res. Rev.12. - P.213-223.
- 8 *Ito T, Kawaoka Y,Vines A et. al.* Continued circulation of reassortant H1N2 influenza viruses in pigs in Japan //Arch Virol. 1998. Vol.143. P. 1773-82.
- 9 *Лаптев С.В., Ямникова С.С., Саятов М.Х. и др.* Изучение биологических и антигенных свойств вирусов гриппа А(H1N1), выделенных от свиней в Восточном Казахстане //Известия АН КазССР. №2.-1987.-С.55-58.
- 10 *Goureaux J, Kaiser C., Valette M. et. al.* Isolation of two H1N2 influenza viruses from swine in France //Arch.Virol. 1994. Vol. 135 (3-4).-P.365-382.
- 11 *Van Reeth K., Brown I.H., Pensaert M.* Isolations of H1N2 influenza A virus from pigs in Belgium //Vet. Res. 2000. - Vol. 13. - P. 588-89.
- 12 *Karasin AI, Olsen CW., Anderson GA.* Genetic characterization of an H1N2 influenza virus isolated from a pig in India //J.Clin Microbiol. 2000. Jun. 38(6). - P. 2453-6.
- 13 *Christopher W., Olsen W., Karasin A., Gene Ericson.* Characterization of a swine-like reassortant H1N2 influenza virus

isolated from wild duck in the United States // *Virus research*. 93, 2003.- P.115-121.

14 From where did the 2009 'swine-origin' influenza A virus emerge? / A. Gibbs, J. Armstrong, J. Downie // *J. Virology*. – 2009. – 6:207. – URL: <http://www.virologyj.com/content/6/1/207>.

15 Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic / G. Smith, D. Vijaykrishna, J. Bahl [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 459. – P. 1122–1125.

16 Кузнецова Т.В., Шаменова М.Г., Баймаханова Б.Б. и др. Мониторинг циркуляции вируса гриппа А среди свиней в Восточном Казахстане // *Ветеринария*. №5(9).- 2009. - С. 52-54.

17 Ишмухаметова Н.Г. «Свиной грипп» А(H1N1) и его распространение среди людей // *Доклады НАН РК*. 2013.- № 4.- С. 96-101.

18 Hoffmann E, Stech J, Guan Yet. al .Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. // *Arch Virol*. - 2001. - № 146 (12).- P. 2275-89.

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

20 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // *Amer. J. Hyg.*- 1938.- Vol. 27.- P.493.

21 Amino D. Method for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids // *Biochem*. - 1961. - Vol. 81. - P. 384-392.

22 WHO Manual for on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Geneva, 2002.105 pp.

23 Саятов М.Х., Асанова С.Е., Бейсембаева Р.У., Каральник Б.В. Антительныеэритроцитарныедиагностикумы для определения типовой и подтиповой принадлежности вирусов гриппа // *Вопр. Вирусол*. 1985. №1. С. 39-43.