

УДК 578.832.1:578:4

*Н.Г. ИШМУХАМЕТОВА, С.Е. АСАНОВА, К.О. КАРАМЕНДИН,  
А.И. КЫДЫРМАНОВ, К.Д. ДАУЛБАЕВА, Е.Т. КАСЫМБЕКОВ,  
К.Х. ЖУМАТОВ, М.Х. САЙТОВ*

## ИЗОЛЯЦИЯ ВИРУСА ГРИППА А/H5N3 ОТ ДИКИХ ГУСЕЙ В ЦЕНТРАЛЬНОМ КАЗАХСТАНЕ И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК

При вирусологическом обследовании 82 биопроб, собранных от диких гусей в октябре 2009г. на территории Аршалинского района Акмолинской области, выделено 14 гемагглютинирующих агентов, 9 из которых идентифицированы как вирусы гриппа А подтипа H5N3. Результаты секвенирования нуклеотидных последовательностей генов гемагглютинина вирусов гриппа А/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09 и А/серый гусь/Центральный Казахстан/3735/09 (H5N3) показали, что они отличаются от эталонного варианта А/крячка/Южная Африка/1/61 (H5N3) и в филогенетическом отношении более близки с 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), образуя с ними отдельный кластер. Наличие одной дополнительной вставки аргинина в сайте расщепления гемагглютинина (PQGETRGLFG) может указывать на возможную циркуляцию предшественника высокопатогенного варианта вируса в популяциях диких гусей в Центральном Казахстане.

Озерные системы Центрального Казахстана, расположенные на пересечении Центрально-азиатского и Сибирско-Восточно-Африканского пролетных путей, являются важными водно-болотными угодьями для перелетных птиц во всей Центральной Азии [1]. В период летней линьки и осенней миграции здесь скапливается огромное количество различных видов диких птиц водного, околоводного и наземного комплексов, что создает благоприятные условия для заражения гриппом домашних уток и гусей, а также синантропных птиц (голуби, сороки, вороны, грачи, скворцы и воробы), распространяющих вирусы гриппа по отдельным животноводческим хозяйствам [2 ; 3 ; 4 ].

Целью настоящей работы явилась изоляция, идентификация и изучение филогенетических взаимосвязей вирусов гриппа, циркулирующих в популяциях диких гусей в Акмолинской области.

### Материалы и методы

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 использовали коммерческую тест-систему Directigen Flu A фирмы Becton Dickinson (Sparks, США) [5 ].

Определение подтипа гемагглютинина (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 M. Lipkind (Израиль) и референсной лабораторией ВОЗ по гриппу в Вейбридже (Англия). Для удаления неспецифических ингибиторов иммунные сыворотки обрабатывали рецепторразрушающим энзимом (RDE) из неочищенного фильтрата V. Cholerae (Denka Seiken Co., Ltd. Tokyo, Japan). К одной части неразведенной сыворотки добавляли три объема RDE. Смесь оставляли при +37°C в течение 18 ч., затем прогревали при температуре +56°C в течение 30 мин и добавляли шесть частей физиологического раствора для получения конечного разведения сыворотки 1:10.

Идентификацию подтипа нейраминидазы (НА) изолятов вируса гриппа проводили в реакции ингибции нейраминидазной активности (РИНА) согласно рекомендации ВОЗ [6 ]. Для этого использовали набор моноспецифических диагностических сывороток к НА вирусов гриппа А подтипов N1-N9, любезно предоставленный доктором M. Lipkind (Израиль). Сыворотки предварительно разводили 1:10 в забуференном физиологическом растворе (рН 7,2) и прогревали при +56°C в течение 30 мин.

Таблица 1. Характеристика биологических образцов, собранных от диких гусей в 2009г. в Акмолинской области, и предварительная идентификация гемагглютинирующих агентов

Отряд	Семейство	Виды	Количество образцов	Количество ГАА
Пластинчатоклювые ( <i>Anseriformes</i> )	Утиные ( <i>Anatidae</i> )	Белолобый гусь ( <i>Anser albifrons</i> )	41	5/4
		Серый гусь ( <i>Anser anser</i> )	33	6/3
		Пискулька ( <i>Anser erythropus</i> )	6	3/2
		Гуменник ( <i>Anser fabalis</i> )	2	—
		Итого:	82	14/9

Примечание: числитель-количество ГАА, знаменатель-количество изолятов вируса гриппа; «-» - ГАА не выделены

Таблица 2. Идентификация подтипа гемагглютинина изолятов вируса гриппа А, выделенных от диких гусей в Акмолинской области в октябре 2009 в РТГА

Иммунная сыворотка	Титр антител к изолятам								
	3733/09	3735/09	3737/09	3742/09	3743/09	3749/09	3752/09	3803/09	3809/09
H1-H3; H6; H8-H16	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PD 620/89 (H4N3)	—	—	—	—	40	—	—	—	—
A/крячка/Ю. Африка/1/61 (H5N3)	2560	2560	2560	1280	2560	1280	1280	1280	1280
A/утка/Гонконг/205/77 (H5N2)	1280	1280	640	640	1280	1280	1280	1280	1280
A/Chicken/Pakistan/1369-R2/95 (H7N3)	80	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание: даны обратные величины титров специфических антител к изолятам; «-» - отрицательные результаты с иммунными сыворотками к вирусам гриппа с подтипами гемагглютинина H1-H3, H6, H8-H16.

Выделение вирусной РНК проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hidden), в соответствии с рекомендациями производителя из 140 мкл вирусодержащей аллантоисной жидкости [7].

ОТ-ПЦР осуществляли единовременно в одношаговой реакции с использованием AccessQuick RT-PCR System (Promega, Madison, WI) [8].

Для секвенирования к ДНК использовали метод дидеоксисеквенирования по Сенгеру [9]. Амплификацию фрагментов ДНК меченых ddNTP проводили на термоциклире BioRad.

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 [10]. 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-канальном 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 [11] методом «присоединения соседей» с использованием последовательностей из GeneBank.

## Результаты исследований

В результате вирусологических исследований 82 биопроб, собранных в октябре 2009г. на территории Аршалинского района Акмолинской области от четырех видов пернатых семейства Anatidae отряда Anseriformes (белолобый гусь, серый гусь, пискулька, гуменник), выделено 14 ГАА (таблица 1). Как видно из таблицы 1, предварительная идентификация ГАА, проведенная с

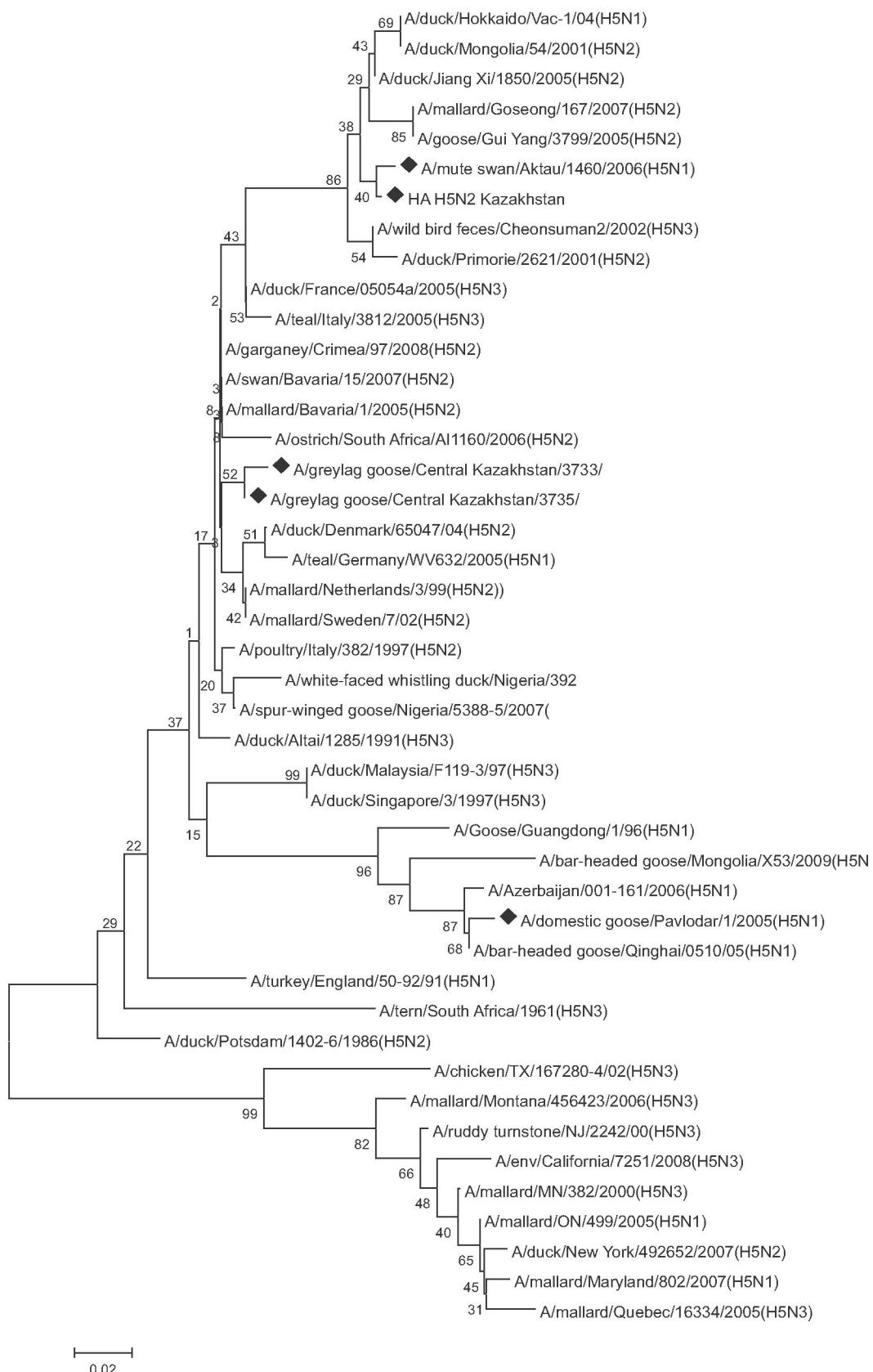


Рис. Филогенетические взаимоотношения между генами НА казахстанских изолятов вируса гриппа А/H5 и вирусами этого подтипа из GenBank

Таблица 3. Идентификация подтипа нейраминидазы изолятов вируса гриппа А, выделенных от диких птиц в Акмолинской области в октябре 2009 в РИНА

Иммунная сыворотка к подтипу нейраминидазы	Титр антineйраминидазных антител к изолятам								
	3733/09	3735/09	3737/09	3742/09	3743/09	3749/09	3752/09	3803/09	3809/09
N1-N2; N4-N9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A/крачка/Ю.Африка/1/61 (H5N3)	100	100	50	100	100	50	100	100	100

Примечание: титры ингибирования нейраминидазной активности представлены в обратных величинах; «-» - отрицательные результаты с диагностическими сыворотками, содержащими антитела к NA N1, N2 и N4 – N9.

Таблица 4. Сравнительная характеристика сайта протеолитического расщепления гемагглютинина казахстанских изолятов вируса гриппа A/H5

Изолят, штамм	Сайт протеолитического нарезания НА													
	P	Q	R	E	T	-	-	-	-	G	L	F	G	
A/лебедь шипун/Актау/1460/2006 (H5N1)	P	Q	R	E	T	-	-	-	-	G	L	F	G	
A/огарь/Южный Казахстан/kz-0783/07 (H5N2)	P	Q	R	E	T	-	-	-	-	G	L	F	G	
A/белолобый гусь/Центр. Казахстан/3733/09 (H5N3)	P	Q	R	E	T	R	-	-	-	G	L	F	G	
A/серый гусь/Центр. Казахстан/3735/09 (H5N3)	P	Q	R	E	T	R	-	-	-	G	L	F	G	

использованием коммерческой тест-системы Directigen Flu A, позволила отнести девять из них к вирусу гриппа А. Четыре изолята вируса выделены от белолобого гуся, три – серого гуся, один изолят получен от пискульки.

Все изоляты вируса гриппа идентифицировали в РТГА и РИНА с использованием наборов референс-сывороток к вирусам гриппа с подтипами НА H1-H16 и НА N1-N9 (таблицы 2, 3).

Из таблицы 2 видно, что гемагглютинирующя активность казахстанских изолятов подавлялась иммунными сыворотками к A/крачка/Ю. Африка/1/61 (H5N3) и A/утка/Гонконг/205/77 (H5N2) в высоких титрах (1:1280-1:2560 и 1:640-1:1280, соответственно).

Активность изолятов 3743/09 и 3733/09 в низких титрах ингибировалась также сыворотками к H4N3 и H7N3 (1:40-80), что, возможно, связано с неполным устранением неспецифических ингибиторов при обработке RDE или стерическим воздействием антineйраминидазных антител, проявляющимся при использовании сывороток с различными сочетаниями НА, но с аналогичным подтипов НА.

Из таблицы 3 видно, что нейраминидазная активность всех изолятов вируса гриппа с подтипов НА H5 подавлялась иммунной сывороткой к референс-штамму A/крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3).

Таким образом, по данным РТГА и РИНА, казахстанские изоляты отнесены к вирусов гриппа А с антигенной формулой H5N3.

Проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей генов НА изолятов вируса A/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09 и A/серый гусь/Центральный Казахстан/3735/09 (H5N3). Результаты сравнительного анализа 799 нуклеотидов, представленных на рисунке, показывают, что эти изоляты отличаются от эталонного варианта A/крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3).

Вирусы гриппа A/H5N3, выделенные в 2009 г. от диких гусей, оказались филогенетически родственными 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) и образуют вместе с ними отдельный кластер.

Известно, что высокопатогенные штаммы вируса гриппа A/H5 в сайте протеолитического нарезания НА содержат дополнительные вставки положительно заряженных аминокислот, таких как аргинин (R), лизин (K) и характеризуются последовательностью –PQGERRKRLFG–. Изоляты A/белолобый гусь/Центральный Казахстан/3733/09 и A/серый гусь/Центральный Казахстан/3735/09 (H5N3) отличались от A/лебедь шипун/Актау/1460/06 (H5N1) и A/огарь/Южный Казахстан/kz-0783/07 (H5N2) наличием одной дополнительной вставки аргинина в сайте расщепления НА (PQGETRGLFG) (таблица 4). Таким образом, изолят, выделенный в Акмолинской области от диких гусей в 2009 г., по сайту

расщепления НА отнесены к слабопатогенному варианту вируса гриппа А.

### Заключение

В 1961 г. в Южной Африке отмечена крупная эпизоотия среди диких пернатых, во время которой изолирован штамм A/крачка/Южная Африка/61 (H5N3), являющийся эталоном подтипа H5 [12, 13]. В 1996-1998 гг. из образцов фекалий диких уток в Сибири выделены вирусы гриппа А, среди которых преобладали штаммы с этим подтипов НА. Сибирские изоляты оказались близкородственными с штаммами вируса гриппа H5N1, выделенными от цыплят и людей в Гонконге в 1997 г., а также с штаммами, циркулировавшими в популяциях домашних птиц в Южном Китае [14]. Показано, что для превращения низкопатогенного вируса в высокопатогенный достаточно вставки даже одной основной аминокислоты в сайте протеолитического расщепления НА [15].

Наличие одной такой вставки в сайте расщепления НА у изолятов вируса гриппа H5N3 2009 г. выделения может указывать на циркуляцию предшественника высокопатогенного варианта вируса среди диких гусей во время их осенней миграции через территорию Центрального Казахстана.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Азиатско-Тихоокеанская Стратегия по охране мигрирующих водно-болотных птиц (документ CMS/CAF/Inf.10) Смотрите <http://www.wetlands.org/IWC/awc/waterbirdstrategy/Downloads/htm>.

2. Организация мониторинга заносов и распространения гриппа птиц в природных условиях на территории Российской Федерации. Временные методические указания. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2006. 30 с.

3. Kaleta E.F., Honicke A. Review of the literature on avian influenza A viruses in pigeons and experimental studies on the susceptibility of domestic pigeons to influenza A viruses of the haemagglutinin subtype H7 // Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2004. Vol. 111. P. 467-472.

4. Kwon Y.K., Joh S.J., Kim M.C. et al. Influenza in magpies (*Pica pica sericea*) in South Korea // J. Wild Dis. 2005. Vol. 41. P. 618-623.

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

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

7. QIAamp® Viral RNA Vini Handbook 12/ 2005.

8. 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.

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

10. 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.

11. 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.

12. Becker W.B. The isolation and classification of ternvirus: influenza A/tern/SA/61 // J. Hyg. 1966. Vol.64. №3. P.309-320.

13. Закстельская Л.Я., Исаченко В.А., Осидзе Н.Г. и др. Некоторые наблюдения циркуляции вирусов гриппа среди домашних и диких птиц// Бюлл. ВОЗ. 1973. т.47. №4. С. 474-478.

14. Okazaki K., Takada A., Ito T. et al. Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia // J. Virol. 2000. Vol.145. №5. P.875-893.

15. Cross K.J., Burleigh L.M., Steinhauer D.A. Mechanism of cell entry by influenza viruses. Expert revive in molecular medicine. <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>.

### References

1. <http://www.wetlands.org/IWC/awc/waterbirdstrategy/Downloads/htm>.
2. *Federal'naja sluzhba po nadzoru v sfere zavity prav potrebitelj i blagopoluchija cheloveka*, 2006, 30 p (in Russ.).
3. Kaleta E.F., Honicke A. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*, 2004, 111, 467-472.
4. Kwon Y.K., Joh S.J., Kim M.C. *J. Wild Dis.*, 2005, 41, 618-623.
5. Harper S., Klimov A., Uyeki T., Fukuda K. *Clin. Lab/ Med.*, 2002, 22, 863-882.
6. Douwdal W.A., Kendal A., Noble G.R. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection.*, Washington, 1979, 585-609.
7. QIAamp® Viral RNA Vini Handbook, 12, 2005.
8. Payungporn S., Phakdeewirot P., Chutinimitkul S. *Viral Immunology*, 2004, 17, 588-593.
9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. *PNAS*, 1977, 74, 5463-5467.
10. Hoffman E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R. *Arch. Virol.*, 2001, 146, 2275-2289.
11. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4. *Mol. Biol. Evol.*, 2007, 24, 1596-1599.
12. Becker W.B. *J. Hyg.*, 1966, 64, 3, 309-320.
13. Закстельская Л.Я., Исаченко В.А., Осидзе Н.Г. *Бюлл. ВОЗ.*, 1973, 47, 4, 474-478 (in Russ.).
14. Okazaki K., Takada A., Ito T. *J. Virol.*, 2000, 145, 5, 875-893.
15. Cross K.J., Burleigh L.M., Steinhauer D.A. *Mechanism of cell entry by influenza viruses. Expert revive in molecular medicine.* <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>

### Резюме

Ақмола облысы Аршалы ауданының аумағында, 2009 жылдың қазан айында жабайы қаздардан жиналған 82

биологиялық сынаманы вирусологиялық тексеру нәтижесінде 14 гемагглютиндеуші дәнекер бөлініп алдынып, олардың тоғызы грипп А вирусының H5N3 типтари мағына жатқызылды. A/ақмандайлы қаз/Орталық Қазақстан/3733/2009 және A/сүр қаз/Орталық Қазақстан/3735/2009 грипп вирустары гемагглютинин генінің нуклеотидтер тізбегін секвендеу нәтижесі олардың A/қаркылдақ/Оңтүстік Африка/1/61 – эталондық нұсқадан айырмашылығын және жеке кластер қураган ертеректегі батыс европалық штамдармен (A/duck/Denmark/65047/04 (H5N2), A/teal/Germany/WV632/05 (H5N1), A/mallard/Netherlands/3/99 (H5N2), A/mallard/Sweden/7/2002 (H5N2)) филогенетикалық жақындығын көрсетti. Грипп А вирусының 2009 жылғы изоляттары гемагглютининің ажырау сайтында (PQGETRGLFG) аргинин амин қышқылының болуы Орталық Қазақстандағы жабайы қаздар арасында зардалтылығы жоғары нұсқалардың алдыңғы буыны айналымда жүру ықтималдығын көрсетеді.

### Summary

During virological study of 82 biological samples collected from wild geese in October, 2009 on the territory of Akmola oblast(Arshaly region) 14 hemagglutinating agents were isolated, nine of them were identified as influenza virus subtype H5N3.

The results of nucleotide sequencing of hemagglutinin gene of A/white fronted goose/Central Kazakhstan/3733/09 (H5N3) and A/graylag goose/Central Kazakhstan/3735/09 (H5N3) influenza viruses showed that they differ from reference variant A/tern/South Africa/1/61 and phylogenetically are more closest to earlier West-European strains A/duck/Denmark/65047/04 (H5N2), A/teal/Germany/WV632/05 (H5N1), A/mallard/Netherlands/3/99 (H5N2), A/mallard/Sweden/7/02 (H5N2) with which they form separate cluster. The presence of single additional insertion of arginine amino acid in hemagglutinin cleavage site (PQGETRGLFG) indicates to the probable circulation of the precursor of highly pathogenic avian influenza virus variants.