

A. И. КЫДЫРМАНОВ

## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЗАХСАНСКОГО ШТАММА ВИРУСА ГРИППА А/СЕРЫЙ ГУСЬ/КОРГАЛЖЫН/1867/06 (H3N6)

(Представлена академиком НАН РК М. Х. Саятовым)

Представлены результаты секвенирования нуклеотидной последовательности и филогенетического анализа генов внутренних белков M, NP и неструктурного белка NS вируса гриппа A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 (H3N6), выделенного в Центральном Казахстане. Показано, что по M гену все штаммы вируса гриппа подтипа H3N6 четко разделяются на 2 линии – американскую и евразийскую, и исследуемый изолят наиболее близок к вирусу A/лебедь шипун/Актау/ 1460/2006 (H5N1), имеющему иной подтип НА, а также к вирусам A/кряква/Чешская Республика/14884-34/2007 (H9N2) и A/кряква/Нидерланды/26/2005 (H11N2). По составу фрагмента гена NP казахстанский изолят проявил 96 % идентичность с вирусом A/migratory duck/Hong Kong/MP2437/2003 (H6N1) и 99 % – с вирусами A/mallard/Altai/1208/2007(H3N6), A/Anas querquedula/Astrakhan/3091/2002(H4N8) и A/mallard/Netherlands/1/2006(H8N4) по NS гену.

**Введение.** Грипп является самым массовым инфекционным заболеванием вирусной этиологии, представляет большую угрозу общественному здравоохранению, сельскому хозяйству и наносит огромный экономический урон.

Орнитофауна играет основную роль в процессе эволюции и сохранения вируса гриппа А в биосфере и является потенциальным источником эпидемически актуальных вариантов. Представители отрядов *Anseriformes* (утки, гуси и лебеди) и *Charadriiformes* (прибрежные виды вместе с чайками) формируют его естественный резервуар, из которого может происходить трансмиссия возбудителя к другим хозяевам.

В связи с этим глобальное слежение за вирусом гриппа в орнитофауне может сыграть ключевую роль в раннем распознавании угрозы возникновения пандемии и подготовке к ней.

Возможность инфицирования диких птиц (озерная чайка) вирусом гриппа H3N6 впервые установила M. Gresikova et al. [1] в Словакии. Вирусы гриппа (H3N8) с этим же подтипов гемагглютинина (НА), но с другой нейраминидазой (НА) в 1979–1980 гг. доминировали в популяциях околоводных птиц в Прибайкалье и в Бурятии [2].

Вирусы гриппа с подтиром НА Н3 также часто выделялись от свиней, лошадей, китов, тюленей и людей [3, 4].

В октябре 2006 г. в Тенгиз-Коргалжынской системе озер Центрального Казахстана из клоакальных смывов диких серых гусей выделены два гемагглютинирующих агента (ГАА). В настоящей

работе приводится молекулярно-биологическая характеристика штамма вируса гриппа А/серый гусь/Коргалжын/1867/06 (H3N6).

### Материалы и методы

**Сбор полевых материалов.** Клоакальные и трахеальные смывы от птиц водного и около-водного комплексов брали стерильным ватным тампоном, помещали во флаконы с транспортировочной средой, содержащей комплекс антибиотиков и бычий сывороточный альбумин. Пробы до проведения исследований хранили в жидким азоте ( $-19^{\circ}\text{C}$ ).

**Предварительная идентификация, изолятов.** Выделение ГАА проводили путем инокуляции каждой биопробы в аллантоисную полость трех 10-11-дневных куриных эмбрионов и последующей инкубации при температуре  $+36^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч. Аллантоисную жидкость на наличие вируса проверяли в реакции гемагглютинации (РГА) микрометодом с использованием 0,75 % суспензии куриных эритроцитов.

Принадлежность ГАА к вирусу гриппа А устанавливали при помощи коммерческой тест-системы Directigen Flu A фирмы Becton Dickinson (Sparks, США).

Идентификацию подтипа НА изолятов проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием набора диагностических сывороток к вирусам гриппа А с различными сочетаниями поверхностных антигенов.

Идентификацию подтипа НА проводили в реакции ингибиции нейраминидазной активности

(РИНА) с набором моноспецифических диагностических сывороток, содержащим антитела к N1-N9.

**Выделение общей РНК из биологических образцов.** Проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hidden) в соответствии с рекомендациями производителя. РНК экстрагировали из 140 мкл клинических образцов и элюировали в окончательном объеме 50 мкл.

**Полимеразная цепная реакция.** Одношаговую ОТ-ПЦР проводили в термоциклире Eppendorf Gradient при следующих условиях: обратная транскрипция при 48 °C 45 мин, начальная 2 мин денатурация при 95 °C и амплификация в 40 циклов, включающая денатурацию (94 °C, 30 сек), отжиг праймеров (55 °C, 30 сек) и удлинение цепи (72 °C, 30 сек) с последующей окончательной элонгацией при 72°C, 10 мин. Использовали праймеры к матриксному гену [5] с последовательностями: прямой 5'-TGATCTTCTTGA<sub>AA</sub>ATTGCAG-3' и обратный TGTTGACAAAATGACCATCG-3'.

Для визуализации продуктов ПЦР проводили электрофорез в 2 % агарозном геле (Sigma) в течение 30 мин при напряжении 88 В.

**Секвенирование фрагментов к ДНК по методу Сенгера.** Проводили в РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК (г. Астана) с использованием терминирующих дидеоксинуклеотидов на автоматическом 96-каспиллярном секвенаторе ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems). Использовали секвенирующие праймеры для получения полноразмерных сегментов M, NP и NS генов вируса гриппа A [6].

Выравнивание секвенированных последовательностей генов вирусов гриппа A и болезни Ньюкасла с полными нуклеотидными последовательностями генов вирусов американской и евразийской линий проводили с помощью компьютерной программы BioEdit, филогенетический анализ осуществлен в программе Vector NTI.

### Результаты и обсуждение

Коммерческая тест-система Directigen Flu A указала на принадлежность ГАА к вирусу гриппа A.

При постановке РТГА гемагглютинирующая активность изолята A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 подавлялась только иммунными сыво-

ротками к вирусам A/утка/Украина/60 (H3N8) и A/лошадь/Майами/1/63 (H3N8) в титрах 1: 320 и 1:1280, соответственно. В РИНА ферментативная активность данного изолята ингибировалась только иммунной сывороткой к NA N6.

По результатам РТГА и РИНА казахстанский изолят A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 отнесен к вирусу гриппа с антигенной формулой A (H3N6).

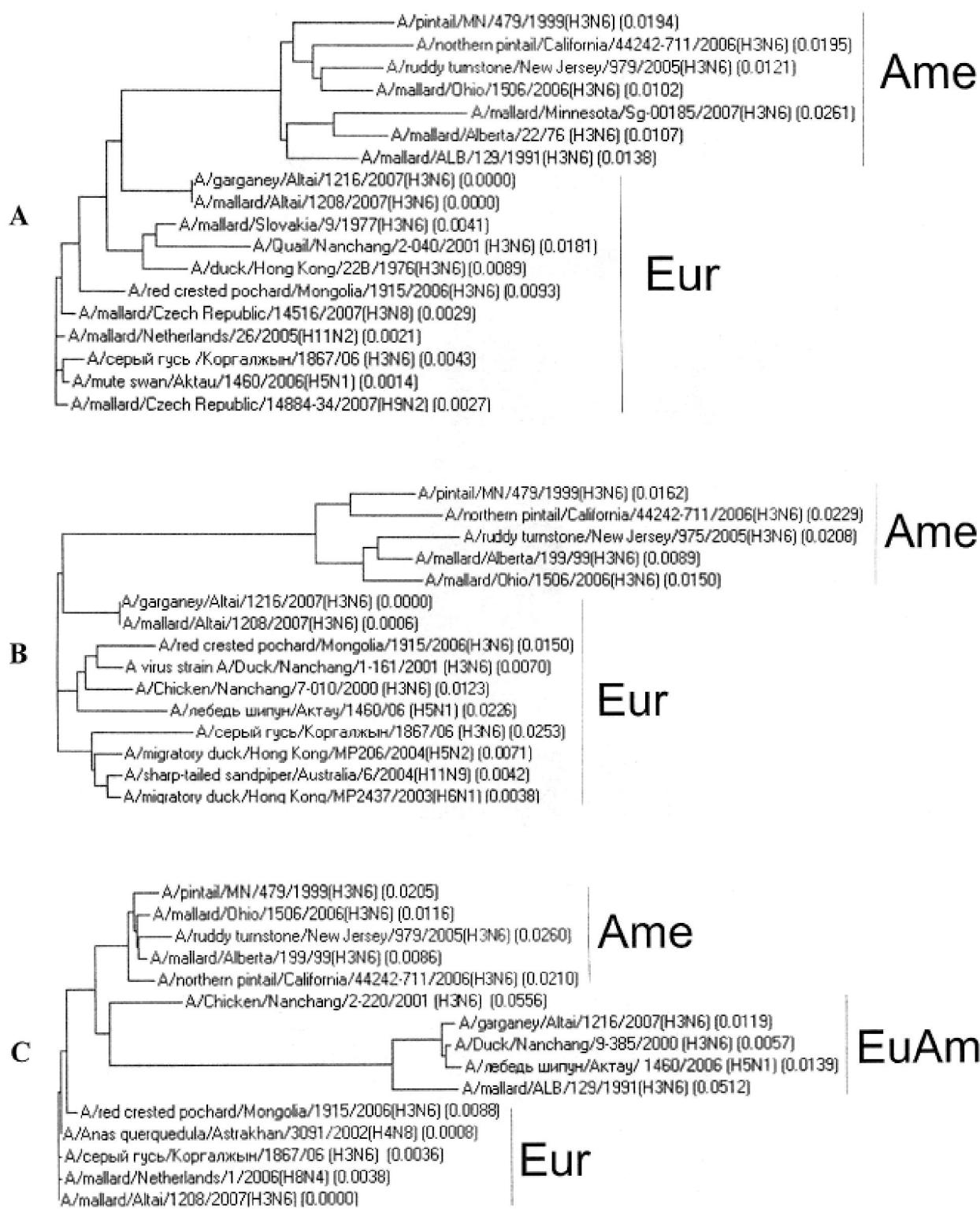
В дальнейшем проведено секвенирование консервативных участков M, NP и NS генов длиной 700, 741 и 577 пар оснований, соответственно. Для определения степени филогенетической близости исследуемого штамма с последовательностями из международной базы данных GenBank использовался метод ближайших соседей со значениями Bootstrap на основе 1000 повторов.

Результаты в виде филогенетического дерева и процента сходства отражены на рисунке и в таблице.

Как видно из рисунка, по M-гену все штаммы вируса гриппа подтипа H3N6 четко разделяются на 2 линии – американскую и евразийскую. Аналогичную картину можно видеть и по NP гену, но по NS гену характерно наличие переходной группы штаммов, состоящих из представителей обеих линий. Очевидно, что формирование этих линий связано с географическим разделением путей миграций птиц.

Следует отметить, что в филогенетическом отношении изолят A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 (H3N6) наиболее близок к вирусу A/лебедь шипун/Актау/ 1460/2006 (H5N1), имеющему иной подтип НА – H5 и изолированному в нашей лаборатории. Сходство с казахстанским изолятом проявили также вирусы, имеющие другой подтип НА – A/кряква/Чешская Республика/14884-34/2007 (H9N2) и A/кряква/Нидерланды/26/2005 (H11N2), что свидетельствует о независимости друг от друга сегментов генома каждого вируса при обмене генетическим материалом.

Анализ последовательностей двух других генов (NP и NS) также показал возможность независимой реассортации различных сегментов генома. В случае NP гена обнаружена 96 % идентичность с вирусом A/migratory duck/Hong Kong/MP2437/2003 (H6N1) и 99 % – с вирусами A/mallard/Altai/1208/2007(H3N6), A/Anas querquedula/Astrakhan/3091/2002 (H4N8) и A/mallard/Netherlands/1/2006(H8N4) по NS гену (табл.).



Примечание. Аме – американская; Еур – евразийская; ЕуАм – смешанная линии.

Филогенетическое древо взаимосвязей М (A), NP (B) и NS (C) генов вируса гриппа A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 и соответствующих генов вирусов из международной базы данных GenBank

**Степень сходства участков NS гена вируса гриппа A/серый гусь/Коргалжын/1867/06  
и вирусов из международной базы данных GenBank**

Штаммы	A/pintail/MN/479/1999(H3N6)	A/northern pintail/California/44242-711/2008(H3N6)	A/red crested pochard/Mongolia/1915/2008(H3N6)	A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 (H3N6)	A/Chicken/Nanchang/2-220/2001 (H3N6)	A/garganey/Altai/1216/2007(H3N6)	A/Duck/Nanchang/9-385/2000 (H3N6)	A/mallard/ALB/129/1991(H3N6)	A/mallard/Ohio/1506/2006(H3N6)	A/ruddy turnstone/New Jersey/979/2005(H3N6)	A/mallard/Alberta/199/99(H3N6)	A/Anas querquedula/Astrakhan/3091/02(H4N8)	A/mallard/Netherlands/1/2006(H8N4)	A/mallard/Altai/1208/2007(H3N6)
A/pintail/MN/479/1999(H3N6)	100	96	91	92	86	69	70	69	97	94	97	92	92	92
A/northern pintail/California/44242-711/2008(H3N6)		100	92	92	87	70	70	70	95	94	96	92	92	92
A/red crested pochard/Mongolia/1915/2008(H3N6)			100	98	90	70	70	70	92	90	92	99	98	98
A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 (H3N6)				100	90	70	70	69	92	90	92	99	99	99
A/Chicken/Nanchang/2-220/2001 (H3N6)					100	68	68	68	87	86	88	91	90	90
A/garganey/Altai/1216/2007(H3N6)						100	98	90	70	70	69	69	69	69
A/Duck/Nanchang/9-385/2000 (H3N6)							100	89	71	70	70	70	70	70
A/mallard/ALB/129/1991(H3N6)								100	70	71	70	69	69	69
A/mallard/Ohio/1506/2006(H3N6)									100	96	98	93	92	93
A/ruddy turnstone/New Jersey/979/2005(H3N6)										100	96	91	90	91
A/mallard/Alberta/199/99(H3N6)											100	93	92	93
A/Anas querquedula/Astrakhan/3091/02(H4N8)												100	99	100
A/mallard/Netherlands/1/2006(H8N4)													100	100
A/mallard/Altai/1208/2007(H3N6)														100

Проведенные нами исследования подтверждают, что семейство утиных играет основную роль в носительстве и распространении штаммов вируса с подтипов НА Н3 [7] по всему Евразийскому и Американскому континентам.

Таким образом, генетические реассортации часто происходят среди вирусов с подтипом НА Н3 и изучение этого феномена может способствовать расширению наших представлений об эволюции вируса гриппа А в природе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cresikova M., Sekeyova M., Tumova B., et al. Isolation of an influenza A virus strain from a bird embryo (*Larus ridibundus*) collected in Slovakia // Acta Virol. 1979. V. 23. P. 89-92.

2. Жезмер В.Ю., Борисова Т.И. Вирусоносительство орто и парамиксовирусов околоводными птицами Прибайкалья // Экология вирусов. М., 1982. С. 163-168.

3. Callan R.G., Early C., Rida H., Hinshaw V.S. The appearance of H3 influenza viruses in seals // J. Gen. Virol. 1995. V. 76, N 1. P. 199-203.

4. Lvov D.K., Zhdanov V.M., Sazonov A.A., et al. Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales // Bull. WHO. 1978. V. 56. P. 923-930.

5. 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. V. 17. P. 588-593.

6. Hoffmann E., Stectr J., Y., Webster R.G., Perez D.K. // Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses // Arch Virol. 2001. V. 146. P. 2275-2289

7. Sharp G.B., Kawaoka Y., Wright S.M., et al. Wild ducks are the reservoir for only a limited number of influenza A subtypes // Epidemiol. Infect. 1993. V. 110. P. 161-176.

### Резюме

Орталық Қазақстанда сұр қаздан бөлінген грипп А вирусы A/сұр қаз/Коргалжын/1867/06 (H3N6) штамының ішкі белоктары M, NP және NS гендерінің нуклеотид ретін секвендеу және филогенетикалық талдау нәтижелері көлтірілген. Грипп вирусы H3N6 типтармалының барлық штамдары M гені бойынша американалық және еуразиялық екі айқын бағытқа бөлінетіні көрсетілген, қарастырылып отырған изолят, өзге гемагглютинин типтармалына ие A/сыбырлак акку/Ақтау/1460/2006 (H5N1) вирусына, сонымен қатар A/барылдауық үйрек/Чех Республикасы/14884-34/2007 (H9N2) және A/барылдауық үйрек/Нидерланды/26/2005 (H11N2) вирусына тым жақын болды. NP гені құрамы бойынша A/migratory duck/Hong Kong/MP2437/2003 (H6N1) вирусымен 96 %, ал NS гені бойынша A/барылдауық үйрек/Алтай/1208/2007 (H3N6), A/даурықпа шүрегей/Астрахань/3091/2002 (H4N8) және A/барылдауық үйрек/Нидерланды/1/2006(H8N4) вирустарымен 99 % сәйкестік көрсетті.

### Summary

The results of nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of internal proteins M, NP and NS genes of influenza A virus A/graylag goose/Korgalzhyn/1867/06 (H3N6) isolated in Central Kazakhstan are presented. It was shown that all the influenza viruses of subtype H3N6 clearly divide on 2 lineages – Eurasian and American by M gene and studied strain is phylogenetically closest to A/mute swan/Aktau/1460/06 (H5N1) that has another HA subtype and A/mallard/Czech Republic/14884-34/2007 (H9N2), A/mallard/Netherlands/26/2005 (H11N2) as well. By structure of NP gene fragment our strain was 96 % close to strain A/migratory duck/Hong Kong/MP2437/2003 (H6N1) and 99 % close to A/mallard/Altai/1208/2007(H3N6), A/garganey/Astrakhan/3091/2002 (H4N8) and A/mallard/Netherlands/1/2006(H8N4) by NS gene.

УДК 578.832.1.083.2

ДГП «Институт микробиологии  
и вирусологии» РГП «ЦБИ»  
КН МОН РК, г. Алматы

Поступила 18.02.10г.