

М.В. Сивай^{1,2}, А.К. Юрлов³, А.В. Друзяка³, К.А. Шаршов², А.М. Шестопалов²

УНИКАЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ВИРУСА ГРИППА У ПТИЦ ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово)

² Новосибирский государственный университет (Новосибирск)

³ Институт систематики и экологии животных СО РАН (Новосибирск)

В ходе мониторинга вируса гриппа птиц на территории России в 2008 году был выделен уникальный штамм вируса A/teal/Chany/7119/2008 H15N4 субтипа. Ранее все вирусы субтипа H15 были выделены только на территории Австралии в 1979 и 1983 гг. Был проведен генетический и антигенный анализ данного штамма, в ходе которого были показаны антигенные отличия исследуемого вируса и референс-штамма A/shearwater/ Australia/2376/1979. Результаты проведенного исследования указывают на необходимость проведения дальнейших мониторинговых работ за вирусом гриппа птиц с целью изучения вновь возникающих вариантов вируса, генетического разнообразия патогена, его эволюции и экологии.

Ключевые слова: вирус гриппа, птицы, Сибирь

RARE INFLUENZA VIRUS SUBTYPES ISOLATED FROM BIRDS OF THE SOUTH OF WESTERN SIBERIA

M.V. Sivay^{1,2}, A.K. Yurlov³, A.V. Druzyaka³, K.A. Sharshov¹, A.M. Shestopalov¹

¹ FBRI State Research Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo

² Novosibirsk State University, Novosibirsk

³ Institute of Animals' systematic and ecology SB RAS, Novosibirsk

During avian influenza virus (AIV) surveillance in Russia, 2008, H15N4 subtype of the virus was isolated. All the H15 viruses had been previously isolated in Australia in 1979 and 1983. This is the first report about isolation of AIV H15 subtype elsewhere. Genetic and antigenic analyses were made. The significant antigenic differences between A/teal/Chany/7119/2008 strain and reference strain A/shearwater/ Australia/2376/1979 were revealed. The results of this study show the necessity of monitoring for avian influenza viruses, study of pathogen genetic variability, evolution and ecology.

Key words: Avian Influenza, Russia, rare subtypes

Вирус гриппа относится к семейству *Orthomyxoviridae*. Геном вируса представлен одноцепочечной молекулой РНК и сегментирован. Вирусы подразделяются на субтипы на основании двух поверхностных гликопротеидов — гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА) [9]. Всего в настоящий момент выделяют 17 субтипов НА и 10 субтипов НА [4, 13]. Природным резервуаром вируса являются дикие водоплавающие птицы отрядов Гусеобразные и Ржанкообразные, однако вирус был обнаружен у людей и других млекопитающих [9].

Существует несколько классификаций вируса гриппа, которые основаны на генетических особенностях вирусов, а также территории и времени выделения вируса. Однако все вирусы гриппа разделяются на две генетически линии — Американскую и Евроазиатскую, исходя из района выделения вируса (Западного или Восточного полушария соответственно) [13]. Новые НА — НА комбинации вируса гриппа А возникают путем реассортации между различными штаммами вируса, выделенными от птиц, людей и свиней [8]. Большинство низкопатогенных вирусов гриппа птиц (НППГ) циркулируют среди водоплавающих птиц. Однако непосредственный контакт диких и домашних птиц в некоторых районах создает благоприятные условия для трансмиссии данных патогенов и вызывает риск образования высоко-

патогенных вариантов вируса (ВПГП), способных вызывать новые пандемии и эпизоотии [10].

Территории Западной Сибири играют важную роль в циркуляции вирусов гриппа птиц. Существуют данные о выделении в регионе различных субтипов вируса [1, 14], в том числе и вирусов ВПГП H5N1 субтипа [6]. Территорию юга Западной Сибири пересекает три миграционных пути перелетных птиц — Центрально-азиатский, Восточноафриканский — Западно-азиатский и Восточно-азиатский — Австралийский. Пересечение миграционных путей способствует «перемешиванию» на одной территории популяций птиц Европы, Африки, Азии и Океании. Таким образом, изучение генетического разнообразия вируса гриппа птиц на территории юга Западной Сибири позволит получить уникальную информацию о разнообразии патогенна, его эволюции.

В мае — сентябре 2008 года в ходе мониторинговых исследований вируса гриппа А у диких птиц юга Западной Сибири был выделен вирус НППГ H15N4 субтипа (A/teal/Chany/7119/2008). Вирус был выделен от птицы вида чирок-свистунок (*Anas crecca*), семейство Утиные. ВПГ H15 субтипа относятся к редким субтипам [8]. Всего в международных базах данных GenBank, GISAID и Flu Database имеется информация о шести штаммах

данного субтипа гена НА, все из которых были выделены на территории Австралии в 1979 и 1983 годах. Данные о выделении вируса гриппа с субтипом Н15 где-либо еще отсутствуют. Первое упоминание о ВГП Н15 субтипа было сделано коллективом авторов во главе с С. Роум. В работе авторов было показано что аминокислотная последовательность субъединицы белка НА-Н15 НА1 имеет наибольшую гомологию с аналогичной субъединицей белка НА-Н7 и составляет 67,5 – 71,3 %. Филогенетический анализ данных субтипов гена НА показал, что субтип Н15 является отдельной генетической линией субтипа Н7 [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Чирок-свистунок был убит охотниками во время осеннего сезона охоты на водно-болотную дичь на территории Чановской озерной системы (Новосибирская область) в августе 2008 года. Клоакальный смыв от птицы был собран с помощью стерильного ватного тампона и помещен в стерильную пробирку, содержащую транспортную среду [16]. Изоляция вируса производилась путем введения первичного биологического материала в аллантоисную полость 10-дневных SPF (specific pathogen free) развивающихся куриных эмбрионов. Наличие вируса в аллантоисной жидкости определялось реакцией гемагглютинации (РГА) и полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени, с использованием технологии Taqman [14]. Выделение вирусной РНК осуществлялось с использованием коммерческого набора SV Total RNA Isolation Kit (Promega, США) согласно инструкции производителя.

Субтипирование вируса осуществлялось с использованием универсальных праймеров на гены НА и NA [10]. Для индикации результатов амплификации проводили электрофоретическое разделение продуктов ОТ-ПЦР в 1,5 % агарозном геле в 1xTAE буфере. ДНК визуализировали после окраски бромистым этидием (Sigma, США) при освещении УФ-светом. Длина фрагментов продуктов реакции определялась в сравнении с используемым ДНК- маркером (Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Литва). Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля производилась коммерческим набором QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

Постановка секвенирующей реакции осуществлялась коммерческим набором BigDye Terminator 3.1v Cyclor (Applied Biosystem, США) согласно протоколу производителя в трех независимых повторностях. В дальнейшем производилась очистка секвенирующей реакции коммерческим набором BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystem, США) согласно протоколу производителя.

Определение первичных последовательностей осуществлялось на автоматическом анализаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США) согласно инструкции производителя.

Патогенность исследуемого штамма определялась на четырех недельных SPF цыплятах

породы Леггорн путем внутривенного введения вирусосодержащей аллантоисной жидкости в объеме 0.2 мл ($10^{6.3}$ ЭИД₅₀). Зараженные цыплята наблюдались в течение 14 дней на проявление клинических признаков заболевания или смертность. Внутривенный индекс патогенности определялся согласно методике, опубликованной ранее [16].

Получение сыворотки против исследуемого штамма вируса осуществлялось на 4-недельных SPF цыплятах породы Леггорн путем внутривенного введения вирусосодержащей аллантоисной жидкости в объеме 2.5 мл ($10^{6.3}$ ЭИД₅₀). По истечению 21 дня у зараженных птиц тотально производился забор крови.

Антигенные свойства вируса были исследованы реакцией торможения гемагглютинации (РТГА) как было опубликовано ранее [16]. Постановка реакции осуществлялась с использованием антигенов и сывороток штаммов A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) и A/shearwater/ Australia/2376/1979.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе мониторинга вируса гриппа у диких птиц юга Западной Сибири в 2008 году нами был выделен штамм вируса A/teal/Chany/7119/2008 от птицы вида чирок-свистунок. Вирус был выделен на развивающихся куриных эмбрионах. Наличие вируса в аллантоисной жидкости было подтверждено методами РГА (титр вируса составил $10^{6.3}$ ЭИД₅₀) и ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Субтип вируса был определен как H15N4, а полученная первичная последовательности гена НА подтвердила низкую патогенность вируса. Полученные первичные последовательности всех генов вируса были депонированы в международную базу данных GenBank под номерами CY098537-CY098544.

Определение патогенности выделенного штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) производилось путем заражения 6-ти 4-недельных SPF цыплят породы Леггорн. Зараженные цыплята наблюдались в течение 14 дней на проявление клинических признаков заболевания или смертность. По истечению данного времени все зараженные птицы были клинически здоровы. Внутривенный индекс патогенности исследуемого штамма составил 0. Данные результат указывает на низкую патогенность штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4).

Нами были получены антигенные характеристики исследуемого штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4). Мы сравнили кросс-реактивность штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) и референс-штамма A/shearwater/Australia/2376/1979 (H15N6) методом РТГА. Как показано в таблице 1, сыворотка против референс-штамма A/shearwater/Australia/2376/1979 (H15N6) показывает высокую реактогенность с антигеном A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4). С другой стороны, сыворотка против штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) не указывает на кросс-реактивность с референс-штаммом. Тем не менее, сыворотка про-

Результаты РТГА вирусов субтипа H15

Вирус	Сыворотка (ГАЕ/мл)	
	A/shearwater/Australia/2376/1979 (H15N6)	A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4)
A/shearwater/Australia/2376/1979 (H15N6)	1280	≤10
A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4)	640	1280

тив исследуемого штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) может быть использована для диагностики вновь выделяемых вирусов субтипа H15 методом РТГА. Также, результаты данного эксперимента указывают на антигенные отличия между вирусами.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе представлены результаты изучения генетических и антигенных свойств вновь выделенного штамма ПНГП A/teal/Chany/7119/2008 субтипа H15N4. Это первое сообщение о выделении вируса данного субтипа. Ранее вирусы субтипа H15 выделялись только на территории Австралии в 1979 и 1983 гг.

В ходе проведенного антигенного анализа были показаны отличия исследуемого вируса и референс-штамма A/shearwater/Australia/2376/1979. Это может свидетельствовать о том, что вновь выделенные вирус значительно генетически отличны от своих предшественников и могут быть использованы в методах субтипирования вирусов гриппа.

Отсутствие данных о выделении вирусов гриппа субтипа H15 может быть связано с недостаточными мониторинговыми исследованиями за вирусом или с несовершенством методов, используемых для субтипирования патогена. В некоторых научных работах существуют упоминания о вирусах, чей субтип так и не был определен [12]. Это и может свидетельствовать о том, что методы типирования вирусов гриппа нуждаются в доработке.

Чирок-свистунок является одним из наиболее распространенных видов птиц отряда Гусеобразные на территории юга Западной Сибири. Местами зимовки является территория Западной Европы, Средиземноморья и Каспия. В ходе мониторинга вируса гриппа на территории России от птицы вида чирок-свистунок были выделены различные штаммы патогенна [1, 2, 14].

Территория юга Западной Сибири располагается в центре Евразийского континента и пересекается тремя основными перелетными путями диких птиц, объединяя миграционные потоки птиц Европы, Африки, Азии и Океании. Особенности климата данной региона создают благоприятные условия для длительного сохранения вируса в почве и воде. Таким образом, территория юга Западной Сибири играет важную роль в персистенции вирусов гриппа птиц, их эволюции и географическом распространении [5, 14].

Результаты данного исследования указывают на необходимость дальнейшего мониторинга вирусов гриппа среди диких птиц, что позволит и в дальнейшем получать ценные данные о разнообразии вирусных субтипов, их эволюции и географическом распространении. Также необходимо усовершенствование методов идентификации и типирования патогена, которое должно быть построено на постоянно изменяющихся данных о генетике вируса гриппа.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 12.741.12.0153, № 16.740.11.0179, № 02.740.11.0709, № 11.519.11.2014) и гранта по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализ циркуляции вирусов гриппа типа А, выделенных на территории Чановской озерной системы / М.В. Сивай [и др.] // Вестник НГУ. – Серия: Биология, клиническая медицина. – 2010. – Т. 8., Вып. 2. – С. 25 – 28.
2. Комплексный эпизоотологический мониторинг вируса гриппа А на территории Сибири и Дальнего Востока: Методические рекомендации / В.Ю. Марченко [и др.]. – 2011.
3. A complete analysis of HA and NA genes of influenza A viruses / W. Shi [et al.] // PLoS One – 2010. – Vol. 5. – P. 14454.
4. A distinct lineage of influenza A virus from bats / S. Tong [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2012. – Vol. 109. – P. 4269 – 4274.
5. An atlas of movements of Southwest Siberian waterbirds / J. Veen [et al.] // Wetlands International. – 2005.
6. Characteristic of high pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 isolated from common gull (Larus canus) / K.A. Sharshov [et al.] // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. – 2010. – P. 29 – 32.
7. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes / C. Rohm [et al.] // Virology – 1996. – Vol. 217. – P. 508 – 516.
8. Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses in the human population during 2001 / V. Gregory [et al.] // Virology. – 2002. – Vol. 300. – P. 1 – 7.
9. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G. Webster [et al.] // Microbiol. Rev. – 1992. – Vol. 56. – P. 152 – 179.

10. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico / M. Garcia [et al.] // J. Gen. Virol. — 1996. — 77 (Pt 7). — P. 1493–1504.

11. Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange / S. Krauss [et al.] // PLoS Pathog. — 2007. — Vol. 3. — P. 67.

12. Influenza-a viruses in ducks in northwestern Minnesota: fine scale spatial and temporal variation in prevalence and subtype diversity / B.R. Wilcox [et al.] // PLoS One — 2011. — Vol. 6. — P. 24010.

13. Panorama phylogenetic diversity and distribution of Type A influenza virus / S. Liu [et al.] // PLoS One — 2009. — Vol. 4 — P. 5022.

14. Surveillance of Influenza A Virus in Wild Birds in the Asian Part of Russia in 2008 / M.V. Sivay [et al.] // Avian Diseases. — 2012 (in press).

15. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses / E. Hoffmann [et al.] // Arch Virol. — 2001. — Vol. 146. — P. 2275–2289.

16. WHO. Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. World Health Organization. — China, Harbin, 2002.

Сведения об авторах

Сивай Мария Владимировна – аспирант, младший научный сотрудник (630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», e-mail: sivaum@hotmail.ru)

Юрлов Александр Константинович – к.б.н., ведущий научный сотрудник

Друзьяка Алексей Валерьевич – к.б.н., младший научный сотрудник

Шаршов Кирилл Александрович – к.б.н., заведующий лабораторией

Шестопалов Александр Михайлович – д.б.н., заведующий отделом