

DOI:10.26104/NNTIK.2023.51.31.006

Абаева М.Р., Усербаев Б.С., Кендирбаева С.К., Султанкулова К.Т.

**КАНАТТУУЛАР ТУМООСУ ВИРУСУНУН H5N8
СУБТИПИНИН ПАТОГЕНДИК МАРКЕРЛЕРИН АНЫКТОО**

Абаева М.Р., Усербаев Б.С., Кендирбаева С.К., Султанкулова К.Т.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ПАТОГЕННОСТИ
ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ СУБТИПА H5N8**

M. Abayeva, B. Usseybayev, S. Kendirbaeva, K. Sultankulova

**DETERMINATION OF PATHOGENICITY MARKERS
OF H5N8 SUBTYPE AVIAN INFLUENZA VIRUS**

УДК: 578.287

Бул макалада канаттуулардын тумоосунун H5N8 вирусунун жаңы штаммдары изилденет. Ошондой эле жапайы каздан бөлүнүп алынган канаттуулардын тумоосунун вирусунун A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) штаммынын гемагглютинин (HA) жана нейраминидаза (NA) генинин генетикалык анализинин натыйжалары келтирилген. 2021-жылдын күзүндө Казакстан Республикасынын аймагында, Костанай облусунун Койбагар көлүндө жашаган. REKRRKR/GLF гемагглютининин бөлүнүү участогунун аминокислота ырааттуулугунун белгиленген атайын топтомду изилденүүчү штаммдын грипп вирусунун жогорку патогендүүлүгүн аныктайт. N8деги беш аминокислота алмаштырууга ылайык (46,106,145,477 жана 449 позицияларында) изилденген A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) казакстан штаммынан (ON943056) A/chicken/Kazakhstan/23/2020 (H5N8). Ошондой эле, 2021-жылдын сезонунда бөлүнүп алынган канаттуулар тумоосунун вирусунун казакстандык A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) штаммынын NA протеининде бир гана N8 G147V мутациясы аныкталган.

Негизги сөздөр: грипп, вирус, аминокислота алмаштыруу, гемагглютинин, нейраминидаза, нуклеотид.

В данной статье исследуется новый штамм вируса гриппа птиц субтипа H5N8, который вызывает опасения. Также представлены результаты генетического анализа гена гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) штамма A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) вируса гриппа птиц, выделенного от дикого гуся, обитавшего на озере Койбагар Костанайской области на территории Республики Казахстан, осенью 2021 года. Установленный специальный набор аминокислотной последовательности сайта расщепления гемагглютинина REKRRKR/GLF, определяет высокопатогенность вируса гриппа исследуемого штамма. По пяти аминокислотным заменам (в позициях 46, 106, 145, 477 и 449) в N8 изучаемый штамм A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021 (H5N8) отличается от казакстанского штамма (ON943056) A/chicken/Kazakhstan/23/2020 (H5N8). Также была выявлена только одна мутация N8 G147V в белке NA казакстанского штамма A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) вируса гриппа птиц, выделенного в течение сезона 2021 г.

Ключевые слова: грипп, вирус, аминокислотная замена, гемагглютинин, нейраминидаза, нуклеотид.

This article investigates a new strain of the H5N8 avian influenza virus that is of concern. Also presented are the results of a genetic analysis of the hemagglutinin (HA) and neuraminidase

(NA) gene of the A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) strain of the avian influenza virus isolated from a wild goose that lived on Lake Koybagar, Kostanay region, on the territory of the Republic of Kazakhstan, fall 2021. The established special set of amino acid sequence of the REKRRKR/GLF hemagglutinin cleavage site determines the highly pathogenicity of the influenza virus of the studied strain. According to five amino acid substitutions (at positions 46, 106, 145, 477 and 449) in N8, the studied strain A/wild goose /Kostanai/KZ/83/2021 (H5N8) differs from the Kazakh strain (ON943056) A/chicken/Kazakhstan/23/2020 (H5N8). Also, only one mutation N8 G147V was detected in the NA protein of the Kazakh strain A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) of the avian influenza virus isolated during the 2021 season.

Key words: influenza, virus, amino acid substitution, hemagglutinin, neuraminidase, nucleotide.

Введение. Вирус гриппа А – вирусное заболевание диких и домашних птиц, характеризующееся, в первую очередь, поражением органов дыхания и пищеварения, из семейства ортомиксовирусов (*Orthomyxoviridae*) [1]. Вирион гриппа А содержит вирусные гены HA и NA, которые кодируют его белки [2]. Поверхностный антиген, HA, связывается с концевыми сиаловыми кислотами гликопротеина и гликолипидов на клетках-хозяевах для проникновения вируса, в то время как NA расщепляет сиаловые кислоты для высвобождения вирионов [3].

В России в 2020 году были зарегистрированы вспышки вируса гриппа А субтипа H5N8. Европейские вирусы гриппа А субтипа H5N8, обнаруженные в течение первых шести месяцев 2020 г. были сгруппированы в две отдельные группы. Первая группа вирусов выделены в Болгарии с генетическим родством с ранее обнаруженными вирусами гриппа в стране с 2018 г. Вторая группа была обнаружена в Венгрии, Чехии, Германии и Польше с начала 2020 г. [4].

В 2020-2021 гг. в Южной Корее и Японии часто были обнаружены многочисленные вспышки вируса гриппа А субтипа H5N8 среди диких и домашних птиц. В 2020-2021 гг. новые вирусы гриппа А субтипа H5N8 также вызвали многочисленные вспышки среди

диких лебедей в провинциях Пекин, Шаньдун, Шаньси и Цзянсу, Китай (Министерство сельского хозяйства и по делам сельских районов Китайской Народной Республики, 2021 год). В феврале 2021 г. в России было зарегистрировано заболевание семи работников птицефабрики, инфицированные новыми вирусами гриппа А субтипа H5N8, и нельзя исключать возможность передачи вируса от человека к человеку (Всемирная организация здравоохранения, 2021 год) [5].

Определение молекулярных маркеров патогенности и геномного разнообразия вируса гриппа А субтипа H5N8 могут способствовать разработке защитных вакцин и терапевтических средств предотвращения пандемии, также изучить проблемы межвидовой передачи (например, от птиц к млекопитающим, от человека к человеку, есть высокий риск появления новых пандемических штаммов вируса) [8].

Материалы и методы. Объекты исследования.

В работе использован штамм A/wildgoose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) вируса гриппа птиц, выделенный от дикого гуся, в Костанайской области осенью 2021г.

Выделение вирусной РНК. Выделение вирусной РНК проведен с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hidden) в соответствии с рекомендациями производителя.

Синтез к ДНК. Синтез к ДНК проведен набором ProtoScript II Reverse Transcriptase (NEB, UK) в соответствии с инструкцией производителя с использованием праймера Uni12(AGCAAAGCAGG).

Проведение ПЦР для выявления генов вируса гриппа А субтипа H5N8 РНК, выделенная из трахеальных смывов птиц анализированы посредством ПЦР с использованием коммерческого набора Q5® - High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, UK).

Компоненты ПЦР смеси: 5x буфер – 5 мкл, Tag полимеразы - 0,25 мкл, 10Мм dNTP – 0,5 мкл, R праймер - 1,5 мкл, F праймер - 1,5 мкл, кДНК - 3мкл, неионизированная вода – 13,25 мкл. Общий объем смеси – 25 мкл.

Праймеры (универсальные Хоффмана [9]) были синтезированы с помощью синтезатора ДНК/РНК Н-

16 (K&A Laborgeraete, Германия).

Температурно-временной режим усиления проведен по программе: 1) 98°C, 30 сек.; 2) 42 циклов 98°C - 10 сек.; 55°C - 30 сек.; 72°C - 2 мин., после усиления 72°C - 7 мин. Амплификацию проводили на термоциклере Mastercycler X50s, Эппендорф (США).

Секвенирование полных генов HA и NA. Образцы для секвенирования были подготовлены с использованием набора для циклического секвенирования BigDye Terminator v3.1 от Applied Biosystems. Секвенирование проводили на автоматическом 16-капиллярном генетическом анализаторе 3130x1 (Applied Biosystems/Hitachi). Нуклеотидные последовательности анализированы и собраны с помощью программы Sequencer v 4.5 [7].

Полученные нуклеотидные последовательности анализированы в программных модулях веб-сайта NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей генов вируса гриппа А осуществлен с помощью программы BLAST в базе данных GeneBank. При помощи комплекса компьютерной программы Mega 11.0 проведено выравнивание нуклеотидной последовательности. Для построения филогенетического дерева и определения генотипа использован набор нуклеотидных последовательностей из международной базы данных GenBank. Филогенетический анализ последовательностей проведен при следующих параметрах: статистический метод - maximum likelihood; филогенетический тест – Bootstrap метод; модель/метод – Kimura 2-параметрическая модель. Расчет генетических дистанций выполнен при следующих параметрах: анализ – Distance Estimation; метод оценки дисперсии – Bootstrap метод; модель/метод – Р дистанция [7].

Результаты и обсуждение. Определена первичная нуклеотидная последовательность поверхностных генов HA и NA штамма A/wildgoose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) вируса гриппа птиц, выделенного от дикого гуся на озере Койбагар Костанайской области в 2021 г. Установлены аминокислотные последовательности HA и NA (рис. 1).

А

```
>(A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8)) hemagglutinin [Influenza A virus]
MENIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLNGVKPLILKD
CSVAGWLLGNPMCDEFIRVPEWSYIVERAKPANDLCYPSLNDYEELKHLISRINHFELILPKSSWSN
HETSLGVSAACPYPQGAPSFRRNVVWLIKKNDAYPTIKISYNNNTNREDLLILWGIHNSNAEEQTNLYKNP
TTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSQVNGQRGRMDFFWTILKPDDAIHFNENGNFIAPEYAYKIVKKGDS TI
MKSGVEYGHNCNKQTPVGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS PLRFKRRKRGLFGA
IAGFIEGGWQGMVDGWYGYHNSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLE
RRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHK
CDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKRREISGVKLESIGTYQILSIYSTAASSLALAIMIAGLSLWMCSNGS
LQCRICI
```

Б

> A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021 (H5N8)

MNPNQKISTIGSISLGLVFNVLHLSIILMVLAMGKSENGICNGTIVRGYNETVRIEKVTQWYNTSVVEYVPHWNE
 GAYINNTEPICDVKGFAPFSKDNIGIRLGSRGHIFVIREPFVSCSPVECRFFLTQGALLNDKHSNETVKDRSPFRTLMSVE
 VGQSPNVYQARFEAVAWSATACHDGKKWMTIGVTGPDSCAIAVVHYGGVPTDIVNSWAGDILRTQESSCTCIQGN
 YWVMTDGPSPNRQAQYRIYKANQGKIIDQADVSFSGGHIEECSCYPNDGKVECVCRDNWMTNRPLVISPDLRYRVG
 YLCAGLPSDTPRGEDAQFVGSCTSPMGNQGYGVKGFGRQGTVDVWMGRTISRTSRSGFEIRIKNGWTQTSKEQIRR
 QVVVDNLNWSGYSGSFTLPVELSGRECLVPCFWVEMVRGRPEERTIWTSSSSIVMCGVNHAIADWSWHDGAILPFDI
 DGM

Рис. 1. Аминокислотная последовательность нейраминидазы (А) и гемагглютинина (Б) штамма A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021 (H5N8) вируса гриппа птиц.

Казахстанский штамм A/wildgoose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) вируса гриппа птиц идентичен высоким уровнем гомологии по гемагглютинину – 99,9% со штаммом A/chicken/Kazakhstan/23/2020(H5N8) вируса гриппа птиц (ON943056). Уровень гомологии казахстанских штаммов вируса гриппа А со штаммами, выделенными в Китае в 2020-2021 гг. составил 98,3-98,91% (табл. 1).

Штамм A/wildgoose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) вируса гриппа птиц является высокопатогенным по

определенному основному сайту расщепления (REKRRKR/GLF) в молекуле НА.

Представленные казахстанские штаммы A/wildgoose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) и A/chicken/Kazakhstan/23/2020(H5N8) (ON943056) вируса гриппа птиц отличаются высоким уровнем гомологии по нейраминидазе – 99,59%. Уровень гомологии казахстанских штаммов вируса гриппа А со штаммами, выделенными в Китае в 2020-2021 гг. составили 98,42 – 98,70% (табл. 1).

Таблица 1

Идентичность генов НА и NA казахстанского штамма A/wildgoose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) со штаммами вируса гриппа А, представленными из GenBank.

№	Описание штамма	Страна	Идентичность гена, в %	
			НА	NA
1.	A/chicken/Kazakhstan/23/2020(H5N8)	Казахстан	99,59	99,9
2.	A/Cygnuscolumbianus/Hubei/51/2020(H5N)	Китай	98,70	97,91
3.	A/chicken/Chiba/T46-11/2021	Япония	98,63	97,85
4.	A/chicken/Egypt/F17230B/2019(H5N8)	Египет	98,43	97,80
5.	A/chicken/Nigeria/VRD21-035B_21VIR2288-1/2021(H5N8)	Нигерия	98,36	98,19

Оценка эволюционной дивергенции показало, что гены НА и NA штамма A/wildgoose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) вируса гриппа птиц дистанцируются от штаммов вируса гриппа птиц А/H5N8, представленных в GenBank.

Выравнивание аминокислотной последовательности нейраминидазы вирусов гриппа А/H5N8 показал десять аминокислотных замен (в позициях 8, 36, 46, 52, 66, 73, 106, 145, 477 и 449) в составе субтипа N8 штамма A/wild goose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8). По пяти аминокислотным заменам (в позициях 46, 106, 145, 477 и 449) в N8 изучаемый штамм A/wildgoose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) отличается от казахстанского штамма (ON943056) A/chicken/Kazakhstan/23/2020(H5N8), выделенного в 2020 г. Также была выявлена только одна мутация N8 G147V в белке NA казахстанского штамма A/wildgoose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) вируса гриппа птиц, выделенного в течение сезона 2021 г.

Заключение. Генетические исследования генов НА и NA казахстанского вируса гриппа птиц А/H5N8 свидетельствуют о наличии в них мутаций. NA штамма A/wildgoose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) вируса гриппа птиц, выделенного в течение сезона 2021 г. по генетической изменчивости отличается от казахстанского штамма (ON943056) A/chicken/Kazakhstan/23/2020(H5N8), выделенного в 2020 г. по пяти аминокислотным заменам. Обнаружен маркер патогенности НА вируса гриппа птиц субтипа H5N8 - сайт расщепления гемагглютинина REKRRKR/GLF, определяющий высокопатогенность исследуемого штамма A/wildgoose/Kostanai/KZ/83/2021(H5N8) вируса гриппа птиц.

Работа выполнена в рамках научно-технической программы: «Биологическая безопасность Республики Казахстан: оценка угроз, научно-технические основы их предупреждения и ликвидации», ИРН OR11474297.

Литература:

1. Бабин Ю.Ю. Тема диссертации и автореферата по ВАК РФ – Разработка методов ПЦР для выявления вируса гриппа птиц подтипов H3, H4, H5 и изучение биологических свойств изолятов вируса, 03.02.02, 2012.
2. Abdullah A. Selim, Ahmed M. Efran, Naglaa Hagag, Ali Zana-ty, Abdel-Hafez Samir, Mohamed Samy, Ahmed Abdelhalim, Abdel- Satar A. Arafa, Mahrous, Mohamed K. Hassan, and Mahmoud M. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N8) Clade 2.3.4.4. Infection in Migratory Birds, Egypt. Naguid Emerg Infect Dis. 2017 Jun; 23(6): 1048-1051. doi: 10.3201/eid2306.162056
3. Von Itzstein M., Wu W.-Y., Kok G.B. et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication // Nature. 1993. № 363. P. 418 - 423.
4. Kim C.U., Lew W., Williams M.A. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzy-
me active site: design, syntesis, and structural analysis of carbo-
cyclic sialicacid analogues with potent anti-influenza activity // J. Am. Chem. Soc. 1997. № 119. P. 681 - 690.
5. Xudong Li , Xiaomin Wang , Hejia Ye , Bo Li, Yiqun Chen, Junhong Chen, Tao Zhang, Ziwen Qiu, Huanan Li , Weixin Jia, Ming Liao, Wenbao Qi Genomic evolution, transmission dynamics, and pathogenicity of avian influenza A (H5N8) viruses emerging in China, 2020
6. Global Consortium for H5N8 and Related Influenza Viruses. Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8. Science 2016, 354, 213–217.
7. Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger data-sets. Molecular Biology and Evolution 33:1870-1874.
8. Шарипов Р.И., Окалелова Т.М., Альпеисов Ш.А. Роль ферментных препаратов в кормлении птицы. / Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. 2014. №3. - С. 129-131.