

УДК: 578.832.1А:57.083.12(571.56)

ВЫДЕЛЕНИЕ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА А СУБТИПА H5N8 НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

В.Ю. Марченко¹, И.М. Суслопаров¹, Н.П. Колосова¹, Н.И. Гончарова¹,
А.В. Шиповалов¹, А.Г. Дурьманов¹, Т.Н. Ильичева¹,
Л.В. Будацыренова², В.К. Иванова², Г.А. Игнатьев², С.Н. Ершова³,
В.С. Тюляхова³, В.Н. Михеев¹, А.Б. Рыжиков¹

¹ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «ВЕКТОР», г. Новосибирск

²Управление Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия), г. Якутск

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Саха (Якутия)», г. Якутск

В данной работе изучены некоторые биологические свойства вируса гриппа типа А H5N8 субтипа. Штамм был выделен от дикой перелетной водоплавающей птицы (Anas penelope) на территории Республики Саха (Якутия). Штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) является высокопатогенным для млекопитающих и оказался подобен штаммам, вызвавшим вспышки среди диких и домашних птиц на территории Юго-Восточной Азии, Европы и Северной Америки в 2010-2015 гг.

Isolation of highly pathogenic influenza A (subtype H5N8) virus on the territory of Republic of Sakha (Yakutia)

**Marchenko V.Y.¹, Susloparov I.M.¹, Kolosova N.P.¹, Goncharova N.I.¹, Shipovalov A.V.¹,
Durymanov A.G.¹, Ilyicheva T.N.¹, Budatcyrenova L.V.², Ivanova V.K.², Ignatiev G.A.², Ershova S.N.³,
Tiuliahova V.S.³, Mikheev V.N.¹, Ryzhikov A.B.¹**

¹FBRI State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Novosibirsk

²Rospotrebnadzor regional office of Republic of Sakha (Yakutia), Yakutsk

³FBHO "Hygienic and Epidemiological center of Republic of Sakha (Yakutia)", Yakutsk

In this work, we investigated biological properties of influenza A (subtype H5N8) virus. The viral strain was isolated from a wild migratory waterfowl bird (Anas penelope) on the territory of Sakha Republic (Yakutia). The strain A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) is highly pathogenic to mammals and is similar to strains that caused outbreaks among wild and domestic birds on the territory of South-eastern Asia, Europe and North America in 2010-2015.

Высокопатогенные вирусы гриппа H5N1 субтипа являются важным объектом наблюдения специалистов. Их способность вызывать масштабные эпизоотии в популяциях домашних птиц наносит существенный экономический ущерб и является угрозой здоровью человека [2, 14]. Вспышки высокопатогенного вируса гриппа регистрируются по сей день, но широкое распространение вируса гриппа H5N8 субтипа в Европе и Азии ставит мировое сообщество перед вопросом о возникновении нового субтипа вируса гриппа с пандемическим потенциалом.

Выделение высокопатогенного вируса гриппа А(H5N8) регистрируется с 2010 года, когда в Китае впервые была зафиксирована изоляция вируса гриппа этого субтипа от домашней утки [17]. Широкое распространение вирус получил в 2014 году, когда стали поступать сообщения о гибели домашней птицы на территории Юго-Восточной Азии, Европы и США. С начала 2014 года в азиатской части были зафиксированы вспышки среди домашних и диких птиц на территории Южной Кореи, Китая и Японии [3, 6, 7, 8]. Был выделен и описан ряд штаммов H5N8, которые представляли собой новый реассортант трех субтипов: H4N2 (A/duck/Hunan/8-19/2009); H5N8 (A/duck/Jiangsu/k1203/2010; and H11N9 (A/environment/Jiangxi/28/2009) [17]. В Европе, с ноября 2014 года, высокопатогенный вирус гриппа H5N8 поразил фермы домашней птицы на территории Германии, Венгрии, Италии, в Нидерландах и Соединенном Королевстве [16]. Предположительно, после первой вспышки в январе 2014 года в Южной Корее вирус распространился в Европу перелетными птицами. Это подтверждается выделением штамма данного субтипа вируса от нескольких видов диких птиц [1, 12]. На этот факт также указывает выделение вируса гриппа H5N8-субтипа на территории Канады и США.

Настоящее исследование посвящено изучению штамма вируса гриппа A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8), выделенного от дикой утки в октябре 2014 года в ходе мониторинга гриппа птиц в северо-восточной части Российской Федерации.

Материалы и методы

Сбор биологического материала от диких и домашних птиц на территории республики Саха (Якутия) осуществлялся сотрудниками Управления Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия) и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в республике Саха (Якутия). Всего за 2014 г. на территории республики было собрано 835 образцов от птиц. Биоматериал был представлен клоакальными мазками, а также фрагментами внутренних органов диких птиц. Собранный материал тестировался на наличие вирусной РНК методом ПЦР в реальном времени в лаборатории ФБУЗ «ЦГиЭ» в Республике Саха (Якутия) и, в случае получения положительного результата, образец доставлялся в ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» для выделения и углубленного изучения.

Выделение вируса гриппа А осуществляли на 10-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), путем инокулирования клоакальных смывов в аллантоисную полость эмбриона и культивирования в течение 3 суток [15]. Аллантоисная жидкость тестировалась на наличие вируса гриппа в реакции гемагглютинации с использованием 0,5% суспензии эритроцитов петуха, а также методом ПЦР в реальном времени.

Вирусная РНК была выделена из аллантоисной жидкости с помощью набора «АмплиПрайм РИБО-сорб» (ООО «НекстБио», Россия). Для обратной транскрипции были использованы универсальные праймеры Uni12 и RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA).

Типирование и субтипирование вируса гриппа было проведено с использованием наборов «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс Influenza virus A H5N1-FL» и «АмплиСенс Influenza virus A-тип-H5, H7, H9-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора).

С целью получения первичной структуры генома вируса была проведена ПЦР с использованием праймеров, специфичных к определённым участкам каждого гена [4], а также реакционной смеси DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA). Выделение ампликонов из агарозного геля проводилось при помощи набора QIAquick gel extraction kit (Qiagen, USA). Выделенные ампликоны использовались в качестве матрицы в реакции секвенирования по методу Сэнгера с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Очистка реакционных смесей осуществлялась при помощи колонок CENTRI-SEP (Princeton Separations, USA). Детекция продуктов реакции проводилась на приборе для капиллярного электрофореза 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Анализ результатов осуществлялся с помощью программы Vector NTI Advance 10 (Invitrogen, USA). Филогенетический анализ был проведён с использованием программы MEGA 5.0 методом minimum evolution. При работе были использованы нуклеотидные последовательности генов вирусов гриппа, опубликованные в базе данных GISAID.

Для определения патогенности штамма вируса гриппа использовали мышей линии Balb/c, самок, с массой тела 12-14 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР». Животных заражали интраназально десятикратными разведениями вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Перед проведением заражения мышей наркотизировали с использованием углекислого газа. Определение значений ЛД₅₀ и ИД₅₀ проводили с использованием компьютерной программы Probit.

Результаты и обсуждение

Штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) был выделен из трахеи свиязи (*Anas penelope*), добытой на территории поселка Белая Гора в Республике Саха (Якутия). Штамм хорошо культивируется в 10-и дневных развивающихся куриных эмбрионах и обладает высокой степенью репродукции, показывая высокий титр вируса в аллантоисной жидкости. В реакции гемагглютинации максимальный титр вируса составил 5120 ГАЕ/мл. При титровании на РКЭ инфекционный титр вируса составил 6,2 lg EID₅₀. Антигенные свойства штамма исследованы в РТГА [4] с сыворотками и антигенами штаммов вируса гриппа H5N1-субтипа различных клад, полученными в ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР». Результаты представлены в табл. 1.

Как видно из таблицы 1, штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) не имеет значимого титра ни с одной из исследованных антисывороток. Антигенное взаимодействие отмечено только с сывороткой к штамму A/Common gull/Chanu/2006 (H5N1) с обратным титром 20.

С целью определения пандемического потенциала штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) были определены количественные показатели инфекционности и вирулентности для лабораторных мышей. Величина 50%-ной инфекционной дозы (ID₅₀) при интраназальном заражении мышей линии Balb/c составила 2,9 lg EID₅₀. Летальная доза (LD₅₀) для мышей составила 4,1 lg EID₅₀, что указывает на наличие вирулентности исследуемого штамма для млекопитающих [9].

Таблица 1.

Антигенные свойства штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8)

Штамм	Сыворотка					
	A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8)	A/Garganey/Altai/1213/2007 (H5N2)	A/Black-Headed gull/Tyva/115/09 (H5N1)	A/chicken/Pymorsky/85/2008 (H5N1)	A/Commom gull/Chany/2006 (H5N1)	A/Goose/Krasnoozerskoye/627/05 (H5N1)
A/Goose/Krasnoozerskoye/627/2005 (H5N1) clade 2.2	<20	<20	320	1280	1280	1280
A/Common gull/Chany/2006 (H5N1) clade 2.2	<20	<20	40	40	10280	1280
A/chicken/Pymorsky/85/2008 (H5N1) clade 2.3.2	<20	<20	1280	5120	<20	640
A/Black-Headed gull/Tyva/115/2009 (H5N1) clade 2.3.2	<20	<20	640	1280	<20	320
A/Garganey/Altai/1213/2007 (H5N2)	<20	320	<20	<20	320	<20
A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) Clade 2.3.4.4	160	<20	<20	<20	20	<20

Был проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов гемагглютинаина и нейраминидазы. Последовательности депонированы в базе данных GISAID (EPI553349, EPI553350).

Анализ нуклеотидной последовательности сайта протеолитического расщепления гемагглютинаина выявил аминокислотную последовательность PLRERRRKGLF, которая является полиосновным сайтом протеолитического расщепления гемагглютинаина. Наличие полиосновного сайта протеолитического расщепления в гемагглютине является главным признаком высокой патогенности штамма [2].

Филогенетический анализ показал высокую степень гомологии генов HA и NA штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) с нуклеотидной последовательностью штаммов Евразийской линии, выделенных в Юго-Восточной Азии от домашней птицы.

Филогенетическое дерево гена HA выделенного штамма и штаммов других субтипов H5 указывает на его принадлежность к генетической кладе 2.3.4.4 (линия Фуджиан-подобных вирусов клады 2.3.4) (рис. 1, 2).

Анализ первичной структуры гемагглютинаина выявил 1 мутацию, расположенную в сайтах связывания антител, что указывает на антигенный дрейф гемагглютинаина H5 по отношению к ранее выделенным вариантам. Мутация A201E встречается только один раз в штамме A/chicken/Egypt/Q1769B/2010(H5N1), выделенном в Египте в мае 2010 года. В гене NA найдено 2 мутации A190T и G271R, которые отличают его от консенсусной последовательности гена N8, и, возможно, мутация G271R может влиять на резистентность к ингибиторам нейраминидазы. Однако, результаты наших исследований активности нейраминидазы штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) в присутствии препаратов занамивир и озельтамивир показали, что 50% ингибирующая доза препарата озельтамивир составила 0,1 nM, занамивира – 0,05 nM, что по критериям ВОЗ позволяет отнести этот штамм к разряду высокочувствительных к ингибиторам нейраминидазы. Полученные данные имеют важное значение для оценки возможного пандемического риска циркулирующего вируса гриппа A(H5N8).

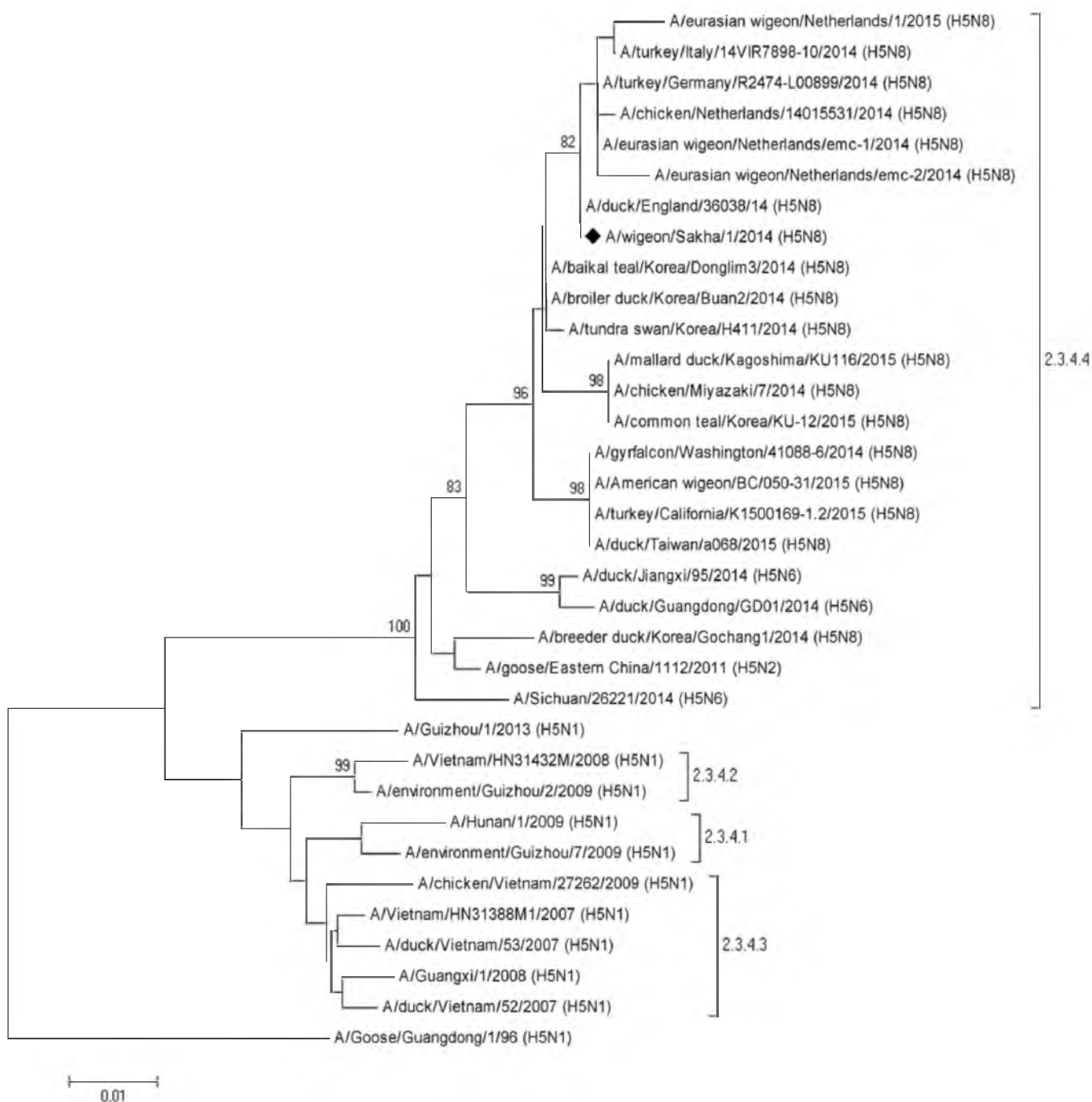


Рис.1. Филогенетическое дерево гена гемагглютинаина HA(A) штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8). Дерево построено при помощи программы MEGA 5.0 (www.megasoftware.net/) с использованием метода minimum evolution (1000 повторов).

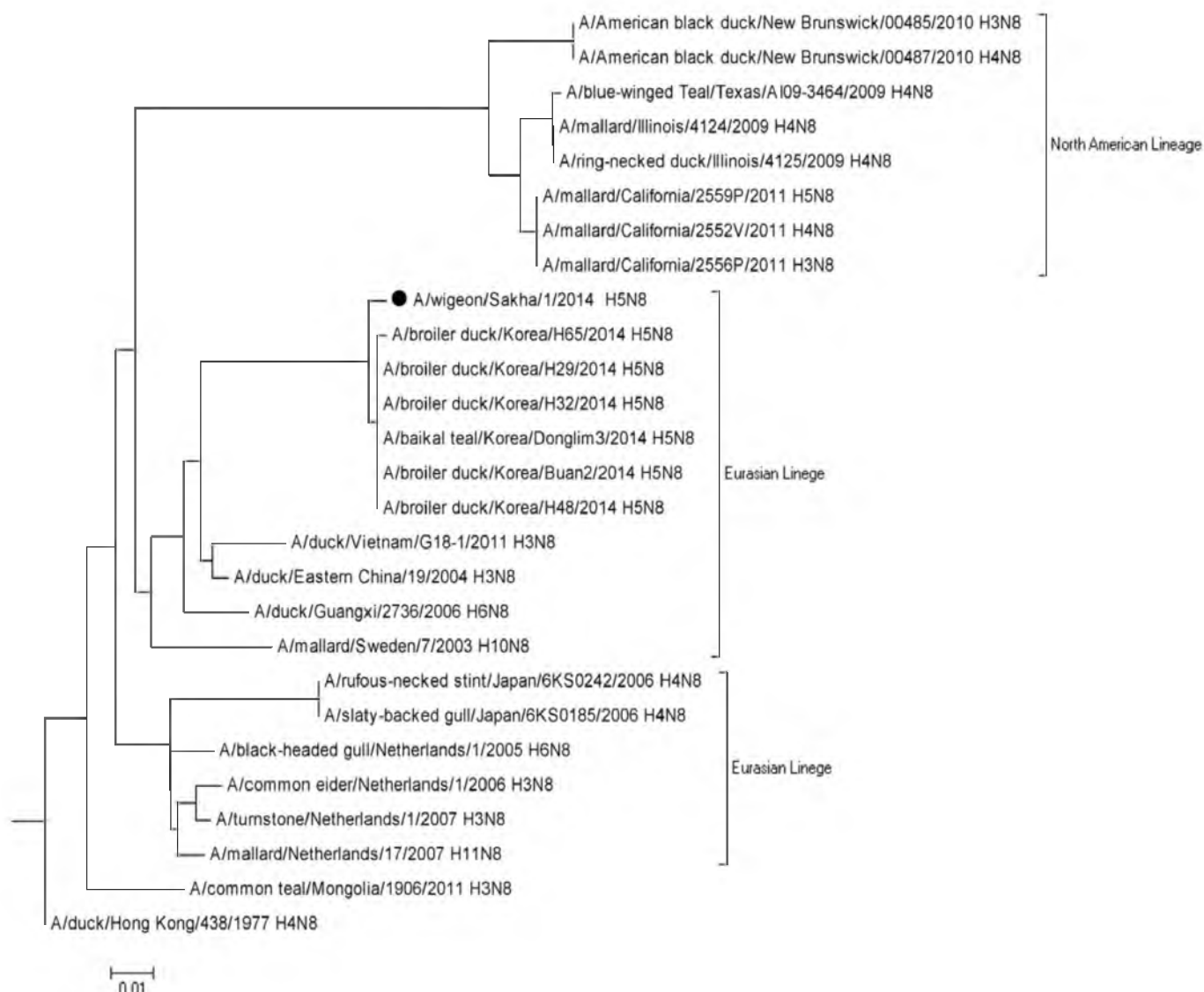


Рис.2. Филогенетическое дерево гена нейраминидазы (NA) штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8). Дерево построено при помощи программы MEGA 5.0 (www.megasoftware.net/) с использованием метода minimum evolution (1000 повторов).

Заключение

Территория Республики Саха является регионом, играющим важную роль в экологии вируса гриппа. Данный регион располагается на пересечении нескольких пролетных путей диких птиц. На территории республики обитает более 300 видов диких птиц, из которых около 220 являются мигрирующими [13]. Это указывает на широкие территориальные связи различных видов птиц, в частности, водоплавающих, которые являются основным резервуаром вируса гриппа птиц [14]. Выделение штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) в России, очевидно, указывает на его распространение мигрирующими дикими птицами из Юго-Восточной Азии. Также он, предположительно, был занесен в 2014-2015 гг. в Европу и Северную Америку [11, 12]. Вспышки высокопатогенного вируса гриппа птиц на территории России регистрируются с 2005 года [10], однако, не все они имели массовый характер. Хронология и характер вспышек высокопатогенного вируса H5N8 в Юго-Восточной Азии, Европе, Северной Америке и появление его на территории России ставит мировое сообщество перед вопросом о возникновении нового субтипа вируса гриппа с пандемическим потенциалом, и, возможно, указывает на способность перелетных птиц к переносу гриппа из Юго-Восточной Азии в Европу, используя приполярный путь миграции через Российское побережье Северного Ледовитого океана. Эта гипотеза также подтверждается исследованиями Verhagen J.H. с соавт. и Ip H.S. с соавт. [5, 11, 12].

На сегодняшний день не зарегистрировано ни одного случая заражения человека вирусом гриппа H5N8, но результаты наших исследований, указывающие на его инфекционность и вирулент-

ность для млекопитающих, а также на его генетическую близость со штаммами, выделенными в Юго-Восточной Азии и в Западной Европе, подчеркивают важность принятия своевременных мер по контролю над распространением вируса гриппа птиц на территории Дальнего Востока и Сибири.

Литература

1. Adlhoch C., Gossner C., Koch G. et al. Comparing introduction to Europe of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8) in 2014 and A(H5N1) in 2005 // *Euro Surveill.* – 2014. – V. 19(50).
2. Alexander D.J. A review of avian influenza in different bird species // *Vet. Microbiol.* – 2000. – V. 74. P. – 3-13.
3. Fan S., Zhou L., Wu D. et al. A novel highly pathogenic H5N8 avian influenza virus isolated from a wild duck in Chin, // *Influenza and Other Respiratory Viruses.* – V. 8(6). – P. 646–653.
4. Hoffmann E., Stech J., Guan Y. et al. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses // *Arch. Virol.* – V. 146. – P. 2275–2289.
5. Ip H.S., Torchetti M.K., Crespo R. et al. Novel eurasian highly pathogenic avian influenza a h5 viruses in wild birds, Washington, USA, 2014 // *Emerg Infect Dis.* – 2015, May. – V. 21(5). – P. 886-90.
6. Jeong J., Kang H.M., Lee E.K. et al. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N8) in domestic poultry and its relationship with migratory birds in South Korea during 2014 // *Veterinary microbiology.* – 2014 Oct 10. – V. 173(3-4). – P. 249-57.
7. Ku K.B., Park E.H., Yum J. et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus from waterfowl, South Korea, 2014 // *Emerging infectious diseases.* – 2014 Sep. – V. 20(9). – P. 1587-8.
8. Lee Y.J., Kang H.M., Lee E.K. et al. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014 // *Emerging infectious diseases.* – 2014 Jun. – V. 20(6). – P. 1087-9.
9. Maines T.R., Lu X.H., Erb S.M. et al. Avian Influenza (H5N1) Viruses Isolated from Humans in Asia in 2004 Exhibit Increased Virulence in Mammals // *J Virol.* – 2005 Sep. – V. 79(18). – P. 11788–11800.
10. Sharshov K., Romanovskaya A., Uzhachenko R. et al. Genetic and biological characterization of avian influenza H5N1 viruses isolated from wild birds and poultry in Western Siberia // *Arch Virol.* – 2010. – V. 155(7). – P. 1145–1150.
11. Verhagen J.H., Herfst S., and Ron A. M. Fouchier. Wild birds may spread the H5N8 virus // *Science* 6 February 2015. – Vol. 347. Issue 6222. – P. 616-617.
12. Verhagen J.H., van der Jeugd H.P., Nolet B.A. et al. Wild bird surveillance around outbreaks of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus in the Netherlands, 2014, within the context of global flyways // *Euro Surveill.* – 2015. – V. 20(12):pii=21069.
13. Vladimirtseva M.V., Germogenov N.I. Birds of Yakutia: Fauna Diversity, Ecology, Role in Ecosystems and Human Life // *J Biodivers Endanger Species.* – 2013. – V. 1. – P. 114.
14. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses // *Microbiol. Rev.* – 1992. – V. 56. – P. 152–179.
15. World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza // WHO. 2011 [опубликовано в 2011г.] доступно на: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/
16. World organization for animal health (OIE). Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type h5 and h7). Paris: OIE; 2015. Accessed [17 Jun 2015]. Доступно на: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2015/>
17. Wu H., Peng X., Xu L. et al. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses in domestic ducks, eastern China // *Emerging infectious diseases.* – 2014 Aug. – V. 20(8). – P. 1315-8.

Сведения об авторах

Марченко Василий Юрьевич – к.б.н, заведующий лабораторией, ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР», E-mail: marchenko_vyu@vector.nsc.ru,

Суслопаров Иван Михайлович – к.б.н, заведующий лабораторией, ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»,

Колосова Наталья Петровна – Ph.d., научный сотрудник, ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР».