

УДК 578.832.1-51.76

БУРЯЧЕНКО С.В., СТЕГНІЙ Б.Т.

ННЦ Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН України,
Україна, 61022, м. Харків, вул. Пушкінська, 83, e-mail: semenb837@gmail.com

ВАРІАБЕЛЬНІ ЛОКУСИ ГЕНІВ *HA*, *NA* ТА *NP* ЯК ЕФЕКТИВНІ РНК – МІШЕНІ ДЛЯ ГЕНОТИПУВАННЯ СУБТИПІВ *A(H1N1)* ТА *A(H7N9)*

Мета. Віруси грипу є серйозним патогеном людини, тварин та птахів, який регулярно викликає епідемії, а також пандемії з високим рівнем смертності. Вірус *H7N9*, апатогенний для птахів, є високовірулентним для людей. Антигенна мінливість та реасортація генів вірусів грипу типу А представляє високий рівень неонатованих даних, що не дозволяє оцінити еволюційну стабільність білків. Визначення варіабельних локусів генів *HA*, *NA* та *NP* двох різних антигенних підтипів вірусу грипу А *H1N1* та *H7N9* дозволить встановити РНК-мішені для генотипування. **Методи.** Проводили аналіз 8 тис. штамів вірусу грипу типу А різних антигенних підтипів виділених від різних господарів із бази даних вірусів NCBI *GenBank* за допомогою програми MEGA 6.0, визначали долю синонімічних та несинонімічних замін у кожній позиції множинних вирівнювань кодуєчих областей нуклеотидних послідовностей. Використовували алгоритм BLAST. Філогенетичні гілки отримували за допомогою програми з використанням алгоритму UPGMA. Аналіз варіабельних локусів білків визначали за алгоритмом *DISORDER*, що передбачує внутрішні неупорядковані області білка. **Результати.** У варіабельних локусах досліджуваних генів виявлені різні типи мутацій. Найбільш варіабельним геном є *HA*, найменше *NP*. У послідовностях гену *NP* переважають синонімічні заміни нуклеотидів. У гені *NA* переважно делеції, менше інсерції та одонуклеотидні заміни. **Висновки.** Виявлена мінливість нуклеотидних послідовностей генів *HA*, *NA* та *NP* у субтипів пташиного грипу А *H1N1* та *H7N9*. Встановлено, що використання варіабельних локусів цих генів дозволяє проводити внутрішньовидову диференціацію штамів збудника пташиного грипу А та визначати приналежність штамів до окремого серотипу.

Ключові слова: нейромінідаза, гемаглютинін, нуклеопротеїд, вірус грипу, варіабельність, генетичні маркери, РНК – мішені, варіабельні локуси, генотипування

Віруси грипу є серйозним патогеном людини, тварин та птахів, який регулярно викликає епідемії, а також пандемії з високим рівнем смертності. Вірус *H7N9*, апатогенний для птахів, є високовірулентним для людей [1–3]. За даними на 2016 рік, з лютого 2013 року вірус викликав інфекції нижніх дихальних шляхів у 798 людини у Китаї, 320 випадків захворювань (40%) призвели до фатального випадку [4]. Усі випадки інфікування є результатом безпосереднього контакту людини із свійськими птахами [5]. Еволюційний аналіз показав, що виділений від людини вірус *H7N9*, представляє собою реассортант, який походить від пташиних вірусів *H9N2*, *H7N3* та *H11N9* [6,7]. Внутрішні гени вірусу *H7N9* належать до тої ж генетичної лінії, що і у вірусу *H5N1*, оскільки в обох вірусів вони мають споріднене походження [8,9]. Вірус несе потенційну небезпеку для людей ще й тому, що із-за низької патогенності не відслітковується у птахів, але при цьому може бути переданий людям. Наявність багаточислених спалахів та осередків вірусу пташиного грипу на території України, виникнення спалахів вірусу у сусідніх країнах потребує розробки ефективного методу молекулярної діагностики штамів пташиного грипу А. Створення такої системи дозволить проводити швидку диференціацію субтипів збудника пташиного грипу А двох субтипів, а також встановлювати джерело походження субтипів та визначати його ландшафтно – географічну приналежність. На сьогоднішній день гостро стоїть проблема виявлення високорозрішачих генетичних маркерів, які можуть бути використанні в якості РНК – мішеней для генотипування субтипів *A(H1N1)* та *A(H7N9)*. Для генотипування субтипів

збудника пташиного грипу А, як правило використовуються достатньо консервативні гени, використання яких дозволяє проводити розділення видів всередині роду *Alphainfluenzavirus* [10–12]. Визначення варіабельних ділянок генетичних маркерів дозволить провести внутрішньовидову диференціацію серотипів та розробити метод експрес – діагностики. Антигенна мінливість та реасортація генів вірусів грипу типу А представляє високий рівень неонатованих даних, що не дозволяє оцінити еволюційну стабільність білків.

Матеріали і методи

Провівши біоінформаційний аналіз даних 8 тисяч субтипів вірусу грипу типу А різних антигенних підтипів виділених від різних хазяїв (людини, свині та птиці) із бази даних вірусів *Influenza Virus Database NCBI Gen Bank* за допомогою програм MEGA 6.0 (показує положення мутацій в структурних моделях), визначали долю синонімічних та несинонімічних замін у кожній позиції множинних вирівнювань кодуєчих областей нуклеотидних послідовностей для 45 субтипів. Використовували алгоритм BLAST та програмне забезпечення MEGA 6.0. Філогенетичні гілки отримували за допомогою програми MEGA 6.0 з використанням алгоритму UPGMA. Аналіз варіабельних локусів білків визначали за алгоритмом *DISORDER*, що передбачує внутрішні неупорядковані області білка. За допомогою програми MEGA 6.0 було отримано найбільшу кількість несинонімічних замін у білках *HA* та *NA*. Виявлення варіабельних ділянок генів *HA*, *NA* та *NP* проводили на основі порівняння їх нуклеотидних послідовностей субтипів пташиного грипу А *H1N1* та *H7N9* представлених в базі даних *NCBI GenBank Influenza Virus Database*.

Результати та обговорення

У послідовностях білка *NP* переважають синонімічні заміни. Згідно результатів аналізу, найбільш варіабельним геном є *HA*, найменш варіабельним *NP*. В локусах гену *HA* (нуклеотидна послідовність U53162.1) переважають делеції, менше інсерції та одонуклеотидні заміни (останні становлять 15,3%). У гені *NA* (нуклеотидна послідовність CY123246.1) переважно делеції, менше інсерції та одонуклеотидні заміни (становлять 8,6%). Результати варіабельності генів *HA*, *NA* та *NP* наведені у табл. 1. Ген *NP* характеризується делеціями та одонуклеотидними замінами, що становлять 4,3%. Доля замін у вибірці кодуєчих нуклеотидних послідовностей для гену *HA* складала 6% несинонімічні заміни, 62% синонімічні та 32% триплети без замін. Для гену *NA* 8% складають несинонімічні заміни, 54% синонімічні та 36% триплети без замін. Ген *NP* показав 20% несинонімічних замін, 6% синонімічних замін та 70% складають триплети без замін (рис. 1). Висока варіабельність гену *HA*, та дещо менша – *NA*, обумовлює здатність вірусу пташиного грипу, зокрема його високовірулентного штаму *H1N1* та менш вірулентного *H7N9* долати міжвидовий бар'єр, тоді як фактор реплікації, що кодується геном *NP*, має менше значення для подолання міжвидового бар'єру, що обумовлює його нижчу, порівняно з *HA* та *NA*, варіабельність.

Таблиця 1. Варіабельність генів *HA*, *NA* та *NP* вірусу пташиного грипу на прикладі штамів *H1N1* та *H7N9*

Ген	Нуклеотид на послідовність	Ділянка гену (позиція нуклеотида 3'–5')	Тип поліморфізму
HA	U53162.1	41-43, 128-129, 191-192, 1068-1070, 1668-1670, 1718	Інсерція
		116-117, 220-223, 241, 295-297, 342-344, 399-400, 405-407, 413-416, 449-450, 459, 515, 560-563, 878-879, 912, 1612-1617, 1701, 1752-1796	Делеція

		Рівномірно послідовності ¹	вздовж всієї	Однуклеоти дна заміна
NA	CY123246. 1	1-20, 146-148, 161-162, 241, 791, 934, 973-974, 1022-1025, 1043-1044, 1053, 1183, 1368, 1385, 1401, 1435, 1461-1480		Делеція
		110, 183, 195-196, 210-212, 222-227, 276, 292-297, 782, 1204, 1267-1268, 1281-1284		Інсерція
		Рівномірно послідовності ²	вздовж всієї	Однуклеоти дна заміна
NP	CY100531	1-45, 1543-1565		Делеція
		Рівномірно послідовності ³	вздовж всієї	Однуклеоти дна заміна

Примітка:¹ відсоток нуклеотидних послідовностей, що мають однуклеотидні заміни – 15,3 %²; -----
-- - 8,6%³; ----- - 4,3%.

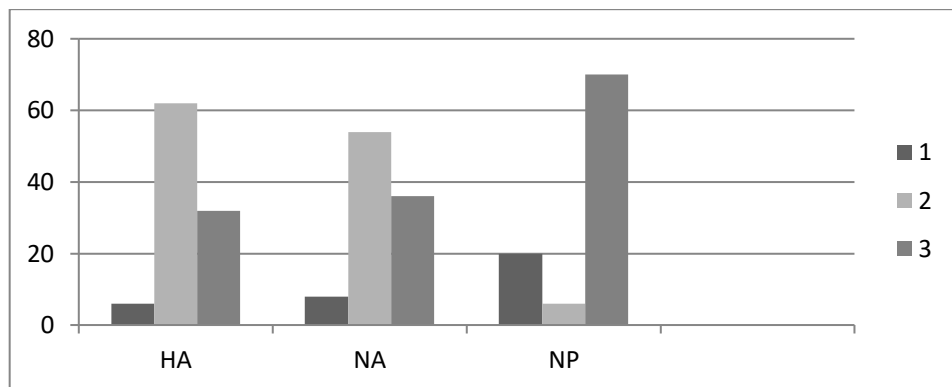


Рис. 1. Доля замін у виборці кодуєчих нуклеотидних послідовностей генів *HA*, *NA* та *NP* вірусу грипу А субтипів *H1N1* та *H7N9*. 1 – несинонімічні заміни; 2 – синонімічні заміни; 3 – однуклеотидні заміни.

В гені *HA* всіх підтипів виявлено 23 мутації та однуклеотидні заміни вздовж всієї нуклеотидної послідовності. Більшу частину становлять делеції та інсерції. Варіабельність нуклеотидної послідовності другого гену - *NA* в якому виявлено 27 мутацій та однуклеотидні заміни вздовж всієї нуклеотидної послідовності дозволить визначати антигенні варіації субтипів *H1N1* та *H7N9*. У гені білку *NP* виявлено 2 мутації і в меншій степені від усіх генів однуклеотидні заміни вздовж всієї нуклеотидної послідовності. У варіабельних локусах досліджених генів *HA*, *NA* та *NP* виявлені різні типи мутацій, використання яких дозволить проводити ефективну диференціацію за видом та серотипом. Розділення по субтипам основного виду по їх приналежності до одного з двох серотипів дозволить проводити на основі мінливості нуклеотидних послідовностей генів *HA*, *NA* та *NP*. Визначення приналежності штаму вірусу А до того чи іншого субтипу здійснюватимемо за варіабельними локусами генів *HA* з нуклеотидними замінами. Визначення антигенних сайтів - найбільш варіабельних та консервативних ділянок досліджуваних генів дає можливість розрахувати праймери та розробити метод експрес – діагностики для виявлення та ідентифікації вірусів грипу типу *A(H1N1)* та *A(H7N9)* за трьома генами *HA*, *NA* та *NP* петльовою ізотермічною реакцією ампліфікації (*LAMP* – метод).

Висновки

1. Визначили дані 8 тисяч субтипів вірусу грипу типу А різних антигенних підтипів виділених від різних хазяїв (людини, свині та птиці) для виявлення варіабельних локусів генів білків *HA*, *NA* та *NP*.

2. Виявлена висока мінливість нуклеотидних послідовностей генів гемаглютиніна (HA), нейромінідази (NA) та нуклеопротеїду (NP) у субтипів пташиного грипу А H1N1 та H7N9.
3. Внутрішній білок нуклеопротеїд NP є більш еволюційно стабільним та менш варіабельним, тоді як поверхневі антигени HA та NA – високоваріабельні та більш мінливі.
4. Отримані варіабельні локуси генів HA, NA та NP є РНК – мішенями для генотипування та створення методу експрес – діагностики.
5. Використання варіабельних локусів цих генів дозволить проводити внутрішньовидову диференціацію штамів збудника пташиного грипу А та визначати приналежність вивчаемого штаму до окремого субтипу або серотипу.
6. На виявлені варіабельні ділянки цих генів будуть розраховані праймери, які будуть використані для петльової ізотермічної реакції ампліфікації для ідентифікації субтипів вірусу.

References

1. Webby R., Hoffmann E., Webster R. 2004. Molecular constraints to interspecies transmission of viral pathogens. *Nat. Med.* 10: S77–S81
2. Cui D., Lau S., Xie G., Guo X., Zheng S., Huang X., Yang S., Yang X., Huo Z., et al. Detection of a novel avian influenza A (H7N9) virus in humans by multiplex one-step real-time RT-PCR assay. *BMC. Infect. Dis.* 2014;14:541. doi: 10.1186/1471-2334-14-541.
3. Dawood F.S., Jain S., Finelli L., Shaw M.W., Lindstrom S., Garten R.J., Gubareva L.V., Xu X., Bridges C.B., Uyeki T.M. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 2009;360:2605–2615. doi: 10.1056/NEJMoa0903810.
4. Bosch B.J., Bodewes R., de Vries R.P., Kreijtz J.H., Bartelink W., van Amerongen G, Rimmelzwaan G.F., de Haan C.A., Osterhaus A.D., Rottier P.J. (2010) Recombinant soluble, multimeric HA and NA exhibit distinctive types of protection against pandemic swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus infection in ferrets. *J. Virol.* 84:10366–10374.
5. Gall A., Hoffmann B., Harder T., Grund C., Ehrlich R., Beer M. Rapid and highly sensitive neuraminidase subtyping of avian influenza viruses by use of a diagnostic DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47:2985–2988. doi: 10.1128/JCM.00850-09.
6. Gao H.N., Lu H.Z., Cao B., Du B., Shang H., Gan J.H., Lu S.H., Yang Y.D., Fang Q., Shen Y.Z., et al. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2013;368:2277–2285. doi: 10.1056/NEJMoa1305584.
7. Gao R., Cao B., Hu Y., Feng Z., Wang D., Hu W., Chen J., Jie Z., Qiu H., Xu K., et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N. Engl. J. Med.* 2013;368:1888–1897. doi: 10.1056/NEJMoa1304459.
8. Ghedin E., Laplante J., DePasse J., Wentworth D.E., Santos R.P., Lepow M.L., Porter J., Stellrecht K., Lin X., Operario D., et al. Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance. *J. Infect. Dis.* 2011;203:168–174. doi: 10.1093/infdis/jiq040
9. Lu S., Li T., Xi X., Chen Q., Liu X., Zhang B., Ou J., Liu J., Wang Q., Zhu B., et al. Prognosis of 18 H7N9 avian influenza patients in Shanghai. *PLoS ONE.* 2014;9:e88728. doi: 10.1371/journal.pone.0088728.
10. Li H., He Z. Magnetic bead-based DNA hybridization assay with chemiluminescence and chemiluminescent imaging detection. *Analyst.* 2009;134:800–804. doi: 10.1039/b819990f.
11. Ma, E. J. Reticulate evolution is favored in influenza niche switching/E. J. Ma, N. J. Hill, J. Zabilansky, K. Yuan, J. A. Runstadler//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – V. 113 (19). – P. 5335–5344.
12. McDonald, S. M. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes/S. M. McDonald, M. I. Nelson, P. E. Turner, J. T. Patton//*Nat. Rev. Microbiol.* – 2016. – V. 14 (7). – P. 448–508

BURIACHENKO S., STEGNIY B.

NSC Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine of the NAAS of Ukraine, Ukraine, 61022, Kharkiv, Pushkinska str., 83, e-mail: semenb837@gmail.com

VARIABLE LOCUS OF HA, NA AND NP GENES AS EFFECTIVE RNA TARGETS FOR GENOTYPING SUBTYPES A(H1N1) AND A(H7N9)

Aim. Influenza viruses are a serious pathogen of humans, animals and birds that regularly cause epidemics, as well as high-mortality pandemics. The H7N9 virus, apathetic to birds, is highly virulent for humans. Antigenic variability and reassortment of influenza A virus genes are a high level of neonatal data, which does not allow to assess the evolutionary stability of proteins. Determination of variable *HA*, *NA* and *NP* gene loci of two different antigenic subtypes of influenza A H1N1 and H7N9 viruses will allow the establishment of RNA targets for genotyping. **Methods.** An analysis of 8,000 avian influenza A strains of various antigenic subtypes isolated from different hosts from the *NCBI GenBank* virus database using the *MEGA 6.0* program determined the fate of synonymous and non-synonymous substitutions at each position of multiple alignments of the coding regions of the nucleotide sequences. The BLAST algorithm was used. The phylogenetic branches were obtained using the program using the *UPGMA* algorithm. Analysis of variable protein locus was determined by the *DISORDER* algorithm, which predicts internal disordered protein regions. **Results.** Different types of mutations are found in variable locus of the studied genes. The most variable genome is *HA*, least *NP*. In sequences of the *NP* gene synonymous nucleotide substitutions prevail. In the genome, *NA* is predominantly deletion, less insertion, and single-nucleotide substitution. **Conclusions.** The variability of nucleotide sequences of *HA*, *NA* and *NP* genes in the subtypes of avian influenza AH1N1 and H7N9 was detected. It has been established that the use of variable locus of these genes allows for the intrinsic differentiation of strains of avian influenza A pathogen and to determine the affiliation of strains to a specific serotype. **Keywords:** neurominidase, hemagglutinin, nucleoprotein, influenza virus, variability, genetic markers, target RNA, variable locus, genotyping