

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*✉ *semenb837@gmail.com*

ВАРІАБЕЛЬНІ ЛОКУСИ ГЕНІВ *HA*, *NA* ТА *NP* ЯК ЕФЕКТИВНІ РНК-МІШЕНІ ДЛЯ ГЕНОТИПУВАННЯ СУБТИПІВ *H1N1* ТА *H7N9*

Мета. Віруси грипу є серйозним патогеном людини, тварин та птахів, які регулярно викликають епідемії. Антигенна мінливість та реасортація генів вірусів грипу 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 *H1* та *H7* дозволить встановити РНК-мішені для генотипування. **Методу.** Проведено аналіз заміни нуклеотидів у кодуючих ділянках генів субтипів вірусу грипу А різних антигенних підтипів, отриманих із бази даних *GenBank* за допомогою програми MEGA 6.0; визначено долю синонімічних та несинонімічних заміни у кожній позиції множинних вирівнювань кодуючих ділянок нуклеотидних послідовностей за алгоритмом BLAST. Аналіз варіабельних локусів білків визначали за алгоритмом DISORDER. **Результати.** У варіабельних локусах досліджуваних генів виявлені різні типи мутацій. Найбільш варіабельними генами є *HA* та *NA*, найменш варіабельним – *NP*. У послідовностях гена *NP* переважають синонімічні заміни нуклеотидів. У гені *NA* переважають делеції та інсерції. **Висновки.** Виявлено мінливість нуклеотидних послідовностей генів *HA*, *NA* та *NP* у субтипів *A H1* та *H7*. Встановлено, що використання варіабельних локусів цих генів дозволяє проводити внутрішньовидову ідентифікацію штамів грипу А та визначати окремий серотип.

Ключові слова: нейромінідаза, варіабельність, генетичні маркери, РНК-мішені, 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, із лютого 2013 року вірус викликав інфекції нижніх дихальних шляхів у 798 людей у Китаї, 320 випадків захворювань

(40 %) призвели до фатального результату [4]. Усі випадки інфікування є результатом безпосереднього контакту людини із свійськими птахами [5]. Еволюційний аналіз показав, що виділений від людини вірус *H7N9* являє собою реасортант, який походить від пташиних вірусів *H9N2*, *H7N3* та *H11N9* [6, 7]. Внутрішні гени вірусу *H7N9* належать до тієї 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 через низьку патогенність не відслідковується у птахів, але при цьому може бути переданий людям. Наявність численних спалахів та осередків вірусу пташиного грипу на території України, виникнення спалахів вірусу в сусідніх країнах потребує розробки ефективного методу молекулярної діагностики штамів пташиного грипу А. Створення такої системи дозволить проводити швидко диференціацію субтипів збудника пташиного грипу А двох субтипів, а також встановлювати джерело походження субтипів та визначати його ландшафтно-географічну приналежність. На сьогоднішній день гостро постала проблема виявлення генетичних маркерів з високою роздільною здатністю, які можуть бути використані як РНК-мішені для генотипування субтипів *A(H1N1)* та *A(H7N9)*. Для генотипування субтипів збудника пташиного грипу А, як правило, використовуються достатньо консервативні гени, застосування 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.

© БУРЯЧЕНКО С. В., СТЕГНІЙ Б. Т.

Матеріали і методи

Провівши біоінформаційний аналіз даних 8 тисяч субтипів вірусу грипу типу А різних антигенних підтипів, виділених від різних живителів (людини, свині та птиці) із бази даних вірусів *Influenza Virus Database NCBI Gen Bank* за допомогою програм MEGA 6.0 (показує положення мутацій у структурних моделях), визначали долю синонімічних та несинонімічних замін у кожній позиції множинних вирівнювань кодуючих ділянок нуклеотидних послідовностей для 45 субтипів. Використовували алгоритм BLAST та програмне забезпечення MEGA 6.0. Філогенетичні гілки отримували за допомогою програми MEGA 6.0 із використанням алгоритму UPGMA. Аналіз варіабельних локусів білків визначали за алгоритмом *DISORDER*, що передбачає внутрішні неупорядковані ділянки 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 у базі даних *NCBI GenBank Influenza Virus Database*.

Результати та обговорення

У послідовностях білка *NP* переважають синонімічні заміни. Відповідно до результатів аналізу, найбільш варіабельним геном є *HA*, найменш варіабельним – *NP*. У локусах гена *HA* (нуклеотидна послідовність U53162.1) переважають делеції, менше інсерції та однонуклеотидні заміни (останні становлять 15,3 %). У гені *NA* (нуклеотидна послідовність CY123246.1) переважно делеції, менше інсерції та однонуклеотидні заміни (становлять 8,6 %). Результати варіабельності генів *HA*, *NA* та *NP* наведені у табл. Ген *NP* характеризується делеціями та однонуклеотидними замінами, що становлять 4,3 %. Частка замін у вибірці кодуючих нуклеотидних послідовностей для гена *HA* склала: 6 % – несинонімічні заміни, 62 % – синонімічні та 32 % – триплети без замін. Для гена *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.). Висока варіабельність гена *HA* та дещо менша – *NA* зумовлює здатність вірусу пташиного грипу, зокрема його високовірulentного 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 зумовлює його нижчу (порівняно з *HA* та *NA*) варіабельність.

У гені *HA* всіх підтипів виявлено 23 мутації та однонуклеотидні заміни вздовж всієї нуклеотидної послідовності. Більшу частину становлять делеції та інсерції. Варіабельність нуклеотидної послідовності другого гена – *NA*, у якому виявлено 27 мутацій та однонуклеотидні заміни вздовж усієї нуклеотидної послідовності, дозволить визначати антигенні варіації субтипів H1N1 та H7N9. У гені білка *NP* виявлено 2 мутації і в меншій мірі від усіх генів однонуклеотидні заміни вздовж усієї 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. Розділ за субтипами основного виду за їх приналежністю до одного з двох серотипів можна 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 А (*H1N1*) та А (*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 хазяїнів (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 цього 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.

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

Ген	Нуклеотидна 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 вздовж всієї послідовності ¹	Однонуклеотидна 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 вздовж всієї послідовності ²	Однонуклеотидна заміна
NP	CY100531	1-45, 1543-1565	Делеція
		Рівномірно вздовж всієї послідовності ³	Однонуклеотидна заміна

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

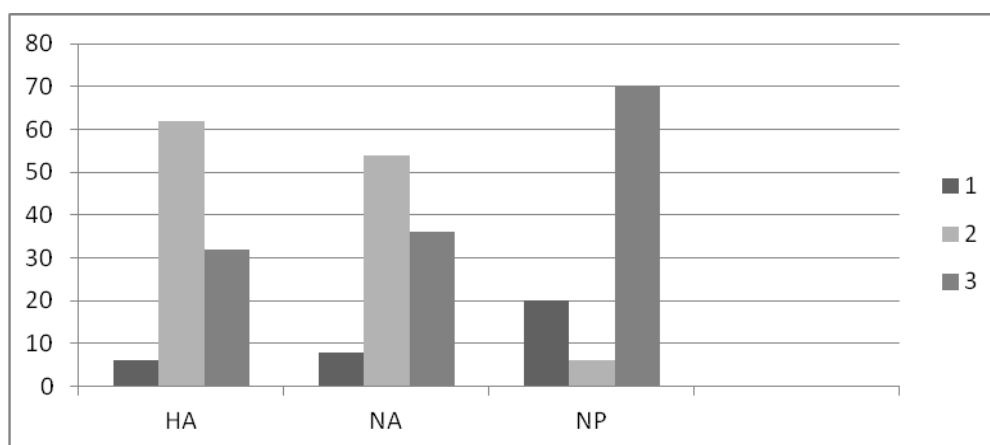


Рис. Частка замін у вибірці кодуючих нуклеотидних послідовностей генів *HA*, *NA* та *NP* вірусу грипу А субтипів H1N1 та H7N9. 1 – несинонімічні заміни; 2 – синонімічні заміни; 3 – однонуклеотидні заміни.

References

1. Webby R., Hoffmann E., Webster R. Molecular constraints to interspecies transmission of viral pathogens. *Nat. Med.* 2004. Vol. 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. Vol. 14. P. 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. Vol. 360. P. 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. 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.* 2010. Vol. 84. P. 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. Vol. 47. P. 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. Vol. 368. P. 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. Vol. 368. P. 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. Vol. 203. P. 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. Vol. 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. Vol. 134. P. 800–804. doi: 10.1039/b819990f.
11. Ma E.J., Hill N.J., Zabilansky J., Yuan K., Runstadler J.A. Reticulate evolution is favored in influenza niche switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. Vol. 113 (19). P. 5335–5344.
12. McDonald S.M., Nelson M.I., Turner P.E., Patton J.T. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. Vol. 14 (7). P. 448–450.

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 LOCI OF HA, NA AND NP GENES AS EFFECTIVE RNA TARGETS FOR GENOTYPING SUBTYPES H1N1 AND H7N9

Aim. Influenza viruses are a serious pathogen of humans, animals and birds that regularly cause epidemics. Antigenic variability and reassortment of influenza A virus genes represent 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 the H1 and H7 influenza virus will allow the establishment of RNA targets for genotyping. **Methods.** An analysis of substitution of nucleotides in the encoding regions of influenza A subtype genes of various antigenic subtypes obtained from the *GenBank* database using the MEGA 6.0 program determined the fate of synonymous and non-synonymous substitutions in each position of multiple alignments of the coding regions of the nucleotide sequences using the *BLAST* algorithm. The analysis of variable locus of proteins was determined by the *DISORDER* algorithm. **Results.** Different types of mutations are found in variable locus of the studied genes. The most variable genes are HA and NA, the least NP. In sequences of the NP gene synonymous nucleotide substitutions prevail. The genome of NA is mainly deletions and insertions. **Conclusions.** The variability of the nucleotide sequences of the HA, NA and NP genes in the subtypes A H1 and H7 was detected. It has been established that the use of variable locus of these genes allows for the identification of influenza A strains and identifies a separate serotype.

Keywords: neurominidase, variability, genetic markers, target RNA, genotyping.