

## Температурная зависимость активности нейраминидазы вирусов гриппа птиц и человека

И.А. ГИСИНА<sup>1</sup>, Е.Э. ПЕРСКИЙ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ветеринарный институт Кимрон, Бейт Даган, Израиль

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

## Temperature Dependence of Neuraminidase Activity of Avian and Human Influenza Viruses

I.L. GISINA<sup>1</sup>, E.E. PERSKIY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kimron Veterinary Institute, Beit Dagan, Israel

<sup>2</sup>Kharkov National University, named by Karazin V.N.

Проведено сравнительное исследование температурных зависимостей активности нейраминидазы вирусов гриппа птиц, которые были выделены в Израиле во время эпизоотии 2000-2004 гг., референтного штамма вируса гриппа птиц и двух референтных штаммов вируса гриппа человека. Показано, что температурный оптимум активности нейраминидазы хронологически более поздних групп вируса гриппа птиц приближается к оптимуму активности референтных штаммов вируса гриппа человека. Это подтверждает гипотезу о возможном переходе вируса гриппа от птиц к человеку и обратно, что является одним из путей эволюции этого вируса.

**Ключевые слова:** вирус гриппа, нейраминидаза, температурная адаптация.

Проведено порівняльне дослідження температурних залежностей активності нейрамінідази вірусів грипу птахів, які були виділені в Ізраїлі під час епізоотії 2000-2004 років, референтного штаму вірусу грипу птахів і двох референтних штамів вірусу грипу людини. Показано, що температурний оптимум активності нейрамінідази хронологічно більш пізніх груп вірусу грипу птахів наближується до оптимуму активності референтних штамів вірусу грипу людини. Це підтверджує гіпотезу про можливий перехід вірусу грипу від птахів до людини і в зворотному напрямку, що є одним із шляхів еволюції цього вірусу.

**Ключові слова:** вірус грипу, нейрамінідаза, температурна адаптація.

The research deals with a comparative study of temperature dependencies of neuraminidase activity of birds influenza viruses, which were obtained in Israel during epizootic 2000-2004, reference strain of birds influenza viruses and two reference strains of human influenza. It was shown that temperature optimum of neuraminidase activity of chronologically later groups of birds influenza viruses approached to the activity optimum of reference strains of human influenza viruses. This confirms the hypothesis about probable transfer of avian influenza viruses to a human and vice versa, which is one of this virus evolution ways.

**Key-words:** influenza virus, neuraminidase, temperature adaptation.

Исследования эволюции вируса гриппа, проведенные в последние годы, показали, что у птиц она происходит намного медленнее, чем у млекопитающих (эволюционный застой). Была высказана гипотеза, что ускорение эволюционных изменений вируса гриппа птиц может происходить в результате его переноса из птичьего "бассейна" в "бассейн" млекопитающих, где он освобождается от "застоя" и может накапливать мутации. Если такой измененный вирус переходит обратно в "бассейн" птиц, то он может стать в нем родоначальником нового генетического варианта [10].

Эта гипотеза подтверждается недавними заболеваниями людей в Китае и Гонконге, которые были вызваны вирусом гриппа птиц H9N2, ранее не поражавшего млекопитающих, и выявлением новых штаммов этого вируса у домашних птиц [6, 9]. Сравнение генетических характеристик этих вирусов, выделенных у человека и птиц, свидетельствует об их близком родстве [4, 5, 7].

**Адрес для корреспонденции:** Перский Е.Э., Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина 61077; тел.: +38 (057) 707-55-02.

Performed recently researches of Influenza viruses evolution have shown, that in birds it proceeds much slower than in mammalians (evolution stagnation). There was hypothesized, that speeding-up of evolution changes in influenza bird virus could take place as the result of its transfer from birds "pool" into mammalians one, where it cleared the "stagnation" and could accumulate mutations. If such changed virus transferred back into birds "pool", it might be an progenitor of new genetic variant [10].

This hypothesis is confirmed by recent human diseases in China and Hong Kong, provoked by H9N2 birds influenza viruses, not affecting mammals previously, and by revealing of this virus new strains in domestic birds [6, 9]. Comparison of genetic characteristics of these viruses, obtained in humans and birds, testifies to their close affinity [4, 5, 7].

Other things been equal the evolution rate depends on generation duration [1]. One of 8 proteins, been comprised in virus particles, is neuraminidase. This

**Address for correspondence:** Perskiy E.E., Kharkov National University named by V.N. Karazin, 4, Svobody square, Kharkov, Ukraine 61077; tel.: +380 57 707 5502.

При прочих равных условиях скорость эволюции зависит от продолжительности генерации [1]. Один из 8 белков, содержащихся в вирусной частице, – нейраминидаза. Этот фермент, отщепляя сialовую кислоту от молекул поверхностных гликопротеидов (клеточных рецепторов), обеспечивает адсорбцию инфицирующего вируса на поверхности клетки.

Естественно, что активность нейраминидазы может быть одним из факторов, лимитирующих продолжительность генерации и скорость эволюции вируса гриппа. Ускорение эволюции вируса при переносе от птиц к млекопитающим при том, что температура тела у первых выше, чем у вторых, может быть обусловлена особенностями температурной зависимости активности нейраминидазы. В работе изучены эти зависимости для нейраминидаз 4-х штаммов вируса гриппа птиц H9N2, выделенных в последние годы, и проведено их сравнение с такими зависимостями для референтного вируса H9N2 и 2-х референтных штаммов вируса гриппа человека.

### Материалы и методы

Исследованные вирусы гриппа были выделены в птицеводческих хозяйствах в Израиле, идентифицированы и размножены в Kimron Veterinary Institute, Department of Avian and Aquatic Animals Diseases, Beit Dagan. Референтные штаммы вируса гриппа предоставлены Dr. Skehel (World Influenza Center, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London).

Все штаммы были размножены в алантоисной жидкости 9-11-дневных куриных эмбрионов [3]. Номенклатура исследованных вирусных штаммов приведена в табл. 1 и 2.

Активность нейраминидазы определяли непосредственно в капсиде вириона, поскольку в её составе и в свободном состоянии она может быть различной. В зависимости от штамма вируса в капсиде одного вириона содержится от 100 до 400

**Таблица 2.** Исследованные референтные штаммы вируса гриппа человека

**Table 2.** Human influenza virus strains under study

Название вируса Virus name	Аббревиатура штамма Strain abbreviation
Singapore/57 (H2N2)	Singapore
Hong Kong/68 (H3N2)	Hong Kong

**Таблица 1.** Исследованные штаммы вируса гриппа птиц (H9N2)

**Table 1.** Avian influenza virus (H9N2) strains under study

Вид птицы Species	Место изоляции Isolation place	Дата изоляции Isolation date	Лабораторный номер Laboratory Nr	Аббревиатура штамма Strain abbreviation
Индюк Turkey	Neve Ilan	30.05.00	90710	ty/ Neve Ilan
Индюк Turkey	Givat Haim	17.01.02	965	ty/965
Курица Hen	Netua	14.07.03	1373	ck/1373
Индюк Turkey	Beit Ha – Levi	28.12.03	1562	ty/1562
Индюк Turkey	St. Wisconsin	1966	Референтный штамм reference strain	ty/wisconsin – 66

enzyme, cutting sialic acid from molecules of superficial glycoproteids (cellular receptor), provides adsorption of infectious virus on cell surface.

It is quite natural that neuraminidase activity can be one of the factors, limiting generation duration and influenza virus evolution rate.

Acceleration of virus evolution during transfer from birds to mammals, if the body temperature in birds is higher than in mammals, can be determined by peculiarities of temperature dependence of neuraminidase activity. In research there were investigated these dependencies for neuraminidase of 4 strains of H9N2 avian influenza viruses and 2 reference strains of human ones.

### Materials and Methods

Investigated influenza viruses were isolated in poultry-farms in Israel, they were identified and propagated in Kimron Veterinary Institute, Department of Avian and Aquatic Animals Diseases, Beit Dagan. Reference strains of influenza viruses were kindly presented by Dr. Skehel (World Influenza Center, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London).

All strains were propagated in alantoic liquid of 9-11 day hen embryos [3]. Nomenclature of investigated virus strains is shown in tables 1 and 2.

Neuraminidase activity was directly determined in one virion capsid, because it can vary in its content and in a free state. Depending on virus strain in the capsid of one virion there are from 100 to 400 neuraminidase molecules and the same number of hemagglutinins molecules, taking part in virus attachment to host-cell [3]. Therefore isolated after propagation strains were normalized to one hemagglutination titer: maximum dilution of virus

молекул нейраминидазы и столько же молекул гемагглютинина, участвующего в прикреплении вируса к клетке-хозяину [3]. Поэтому выделенные после размножения штаммы приводили к одному гемагглютиционному титру – максимальному разведению вирусной суспензии, которое агглютинирует определенное количество эритроцитов [8].

Нейраминидазную активность оценивали по степени гидролиза субстрата – фетуина. Гидролизат окисляли периодатом, нагревали с тиобарбитуровой кислотой, и продукт реакции извлекали кислым бутанолом. Оптическая плотность образовавшегося цветного комплекса прямо пропорциональна активности фермента [8]. Её измеряли при температурах 15, 25, 37, 42 и 56°C. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни [2].

### Результаты и обсуждение

Результаты измерений температурной зависимости активности нейраминидазы при различной дозе вируса, что соответствует разной концентрации фермента, представлены в табл. 3. Как видно, максимумы нейраминидазной активности референтных вирусов гриппа Singapore и Hong Kong, выделенных в 1957 и 1968 годах соответственно, при всех исследованных концентрациях находятся в области 37°C, что отвечает температуре тела человека.

При наибольшей концентрации нейраминидазы её максимальная активность у референтного вируса птиц ty/wisconsin-66, выделенного в 1966 году, находится в широком температурном диапазоне от 37 до 42°C. Уменьшение концентрации фермента приводит к сдвигу максимума его активности к 42°C, что соответствует температуре тела птицы.

Аналогично референтному вирусу при наибольшей концентрации нейраминидаз их максимальные активности у 4-х штаммов вируса гриппа птиц, выделенных во время эпизоотии 2000-2004 гг., лежат в области 37-42°C.

Однако при снижении концентрации фермента сдвиг максимума активности к 42°C происходит только у ty/Neve Ilan и ty/965, выделенных в период с мая 2000 до марта 2002 г. У ck/1373 и ty/1562 (период выделения июль-январь 2003 г.) статистически значимый сдвиг максимума активности нейраминидазы к 42°C отсутствует.

Этот результат можно объяснить, учитывая, что нейраминидазная активность зависит от взаимного расположения субъединиц нейраминидазы и гемагглютинина в вирусной оболочке. Так как вирусная оболочка – это, в сущности, видо-

suspension, which agglutinates a certain number of erythrocytes [8].

Neuraminidase activity was estimated on the degree of substrate hydrolysis, fetuin. Hydrolysate was oxidized by periodate, it was heated with thiobarbiture acid, the reaction product was extracted from acid butanol. Optical density of formed color complex is directly proportional to enzyme activity [8]. It was measured at temperatures of 15, 25, 37, 42 and 56°C. Statistic processing of the results was performed with the Student t-criterion usage and non-parametrical U-criterion Wilcoxon-Mann-Whitney [2].

### Results and discussion

Measurement results of neuraminidase activity temperature dependence at various virus dose, corresponding to different enzyme concentration, are given in Table 3. Maximum neuraminidase activities were found for reference strains of Singapore and Hong Kong influenza, obtained in 1957 and in 1968 years correspondingly, under all investigated concentrations were in the area of 37°C, which is of human body temperature.

At the highest neuraminidase concentration its maximum activity in reference bird virus ty/wisconsin-66, obtained in 1966, is in wide temperature range from 37 to 42°C. An increase of enzyme concentration leads to its activity maximum shift towards 42°C, which corresponds to a bird body temperature.

Similar to reference strain at the highest neuraminidase concentration their maximum activity in 4 strains of bird influenza viruses, obtained during epizootic in 2000-2004 is within the area of 37-42°C.

But during a decrease of enzyme concentration maximum activity shift towards 42°C takes place only in ty/Neve Ilan and ty/965, obtained in the period from May 2000 to March 2002. In ck/1373 and ty/1562 (isolation period June-January 2003) statistically significant maximum neuraminidase activity shift to 42°C is absent.

This result can be explained by the dependence of neuraminidase activity on mutual location of neuraminidase and hemagglutinin subunits in viral shell. Since viral shell is modified cellular cover in its essence, thus the structure of host cell (mammalian or bird) affects mutual location of these units on the surface of viral particle. It can be supposed that in the result of evolution process such redistribution results in the division of bird influenza virus, at least, into two populations with temperature optima of neuraminidase activity at 37 and 42°C, correspondingly. In this case specific part of the first population both in reference virus and in ty/Neve Ilan and in ty/965 is less than in second, that leads to the shift of neuraminidase activity maximum during a decrease of virus particles total concentration towards 42°C.

изменённая клеточная оболочка, то структура клетки хозяина (млекопитающего или птицы) влияет на взаимное расположение этих субъединиц на поверхности вирусной частицы. Можно предположить, что в результате эволюционного процесса такое перераспределение приводит к разделению вируса гриппа птиц, по меньшей мере, на две популяции с температурными оптимумами нейраминидазной активности при 37 и 42°C соответственно. При этом удельная доля первой популяции как у референтного вируса, так и у ty/Neve Pan и ty/965 меньше, чем второй, что и приводит к сдвигу максимума нейраминидазной активности при снижении общей концентрации вирусных частиц к 42°C.

У ck/1373 и ty/1562 удельная доля второй популяции выше, что и определяет более широкий температурный оптимум нейраминидазной активности в этой группе вирусов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что специфичность температурного оптимума активности нейраминидазы вируса гриппа птиц позволяет ему участвовать во внеклеточной стадии распространения в организме млекопитающих, температура тела которых ниже, чем у птиц. При этом (табл. 3) нейраминидазная активность вирусов птиц при

**Таблица 3.** Температурная зависимость активности нейраминидазы вирусов гриппа птиц и человека, ед. оптической плотности

**Table 3.** Temperature dependence of neuraminase activity in avian and human influenza viruses, optical density units

Вирус Virus	Разведение Dilution	Температура, °C Temperature, °C				
		15	25	37	42	56
ty/wisconsin – 66	Неразведенный nondiluted	0,64±0,04	1,20±0,11	2,00±0,28	2,10±0,27 <sup>2</sup>	1,30±0,12
	1:32	0,22±0,02	0,24±0,03	0,52±0,06	0,70±0,08 <sup>1</sup>	0,27±0,04
	1:100	0,17±0,02	0,20±0,02	0,36±0,03	0,55±0,05 <sup>1</sup>	0,26±0,03
ty/Neve Pan	Неразведенный nondiluted	0,54±0,06	0,99±0,10	1,90±0,21	1,90±0,20 <sup>2</sup>	1,22±0,12
	1:32	0,20±0,02	0,26±0,04	0,62±0,04	0,72±0,06 <sup>1</sup>	0,32±0,03
	1:100	0,18±0,02	0,23±0,03	0,42±0,04	0,55±0,05 <sup>1</sup>	0,28±0,03
ty/965	Неразведенный nondiluted	0,56±0,07	1,05±0,11	1,95±0,22	2,00±0,27 <sup>2</sup>	1,25±0,14
	1:32	0,23±0,02	0,22±0,02	0,58±0,06	0,89±0,09 <sup>1</sup>	0,40±0,05
	1:100	0,16±0,01	0,22±0,03	0,45±0,04	0,58±0,07 <sup>1</sup>	0,30±0,06
ck/1373	Неразведенный nondiluted	0,36±0,05	0,90±0,10	1,70±0,18	1,70±0,18 <sup>2</sup>	1,00±0,13
	1:32	0,15±0,01	0,21±0,02	0,40±0,04	0,55±0,07 <sup>2</sup>	0,27±0,03
	1:100	0,11±0,01	0,16±0,02	0,32±0,04	0,32±0,03 <sup>2</sup>	0,24±0,03
ty/1562	Неразведенный nondiluted	0,33±0,05	0,78±0,09	1,60±0,18	1,56±0,16 <sup>2</sup>	0,90±0,08
	1:32	0,17±0,02	0,20±0,02	0,46±0,05	0,39±0,02 <sup>2</sup>	0,28±0,04
	1:100	0,13±0,03	0,15±0,01	0,30±0,03	0,30±0,02 <sup>2</sup>	0,24±0,03
Singapore	Неразведенный nondiluted	0,43±0,07	0,50±0,05	2,00±0,27	1,50±0,17 <sup>1</sup>	0,85±0,09
	1:32	0,070±0,007	0,070±0,008	0,37±0,04	0,25±0,03 <sup>1</sup>	0,20±0,02
	1:100	0,060±0,007	0,060±0,006	0,29±0,03	0,22±0,02 <sup>1</sup>	0,18±0,02
Hong Kong	Неразведенный nondiluted	0,33±0,05	0,40±0,06	1,25±0,13	0,90±0,08 <sup>1</sup>	0,78±0,09
	1:32	0,080±0,006	0,080±0,007	0,30±0,04	0,22±0,02 <sup>1</sup>	0,22±0,03
	1:100	0,070±0,008	0,080±0,007	0,25±0,03	0,20±0,02 <sup>1</sup>	0,17±0,02

**Примечания:** <sup>1</sup> – статистически достоверные различия с показателями при 37°C (p < 0,05); <sup>2</sup> – статистически недостоверные различия с показателями при 37°C (p > 0,05).

**Notes:** <sup>1</sup> – significant differences comparing to data of 37°C (p < 0.05); <sup>2</sup> – non-significant differences comparing to data of 37°C (p > 0.05).

In ck/1373 and ty/1562 specific part of the second population is higher, that determines more wide temperature optimum of neuraminidase activity in this group of viruses.

Thus obtained results testify to the fact, that specificity of temperature activity optimum of

37°C в среднем даже выше, чем у вирусов человека.

### Выводы

При изучении температурной зависимости нейраминидазной активности вирусов гриппа птиц H9N2 обнаружено, что они разделены на две группы. Хронологически более поздняя группа по специфичности свойств нейраминидазы намного ближе к вирусу гриппа человека, чем более ранняя. Этот результат подтверждает гипотезу о возможном переходе вируса гриппа от птиц к человеку и обратно, что является одним из путей эволюции этого вируса.

### Литература

1. Грант В. Эволюция организмов. – М.: Мир, 1980. – 273 с.
2. Иванов Ю.И., Погорелюк О.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
3. Alexander D.J. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens // American Association of Avian Pathologist University of Pennsylvania. – New Bolton Center Kennett Square, 1998. – P. 1348-1692.
4. Alexander D.J. A review of avian influenza in different bird species // Vet. Microbiol. – 2000. – Vol. 74. – P. 3-13.
5. Guan Y., Shortridge K.F., Krauss S. et al. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. // J. Virol. – 2000. – Vol. 74. – P. 9372-9380.
6. Guo Y., Li J., Cheng X. et al. Discovery of humans infected by avian influenza A (H9N2) virus // Chin. J. Exp. Clin. Virol. – 1999. – Vol. 13. – P. 105-108.
7. Lin Y.P., Shaw M., Gregory V. et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 9654-9658.
8. Palmer D.F., Dowdle W. R., Coleman M. T. et al. Advanced Laboratory Techniques for influenza Diagnosis // US Department of Health, Education and Welfare Immunology Series No. 6. – Atlanta: Center for Disease Control, 1975. – P. 147-156.
9. Peiris M., Yuen K. Y., Leung C. W. et al. Human infection with influenza H9N2 // Lancet. – 1999. – Vol. 354. – P. 916-917.
10. Peiris J.S.M., Guan Y., Markwell D. et al. Cocirculation of Avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in Southeastern China: Potential for genetic reassortment? // J. Virol. – 2001. – Vol. 75. – P. 9679-9686.

Поступила 19.11.2004.

neuraminidase activity bird influenza allow it to take part in non-cellular stage of spreading in the mammals organism, which body temperature is lower than in birds. In this case (Table 3) neuraminidase activity of bird viruses at 37°C in average is higher than in human viruses.

### Conclusions

During investigation of temperature dependence of neuraminidase activity of H9N2 avian influenza viruses was revealed that they were divided in two groups. Chronologically later group on specificity of neuraminidase properties is much closer to human influenza virus than earlier one. This result confirms the hypothesis about possibility of bird influenza virus transfer from bird to human and vice versa, which is one of the ways of this virus evolution.

### References

1. Grant V. Evolution of organisms. – Moscow: Mir, 1980. – 273 p.
2. Ivanov Yu.I., Pogorelyuk O.N. Statistic processing of results of medical and biological investigations with programmable microcalculators. – Moscow: Meditsina, 1990. – 224 p.
3. Alexander D.J. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens // American Association of Avian Pathologist University of Pennsylvania. – New Bolton Center Kennett Square, 1998. – P. 1348-1692.
4. Alexander D.J. A review of avian influenza in different bird species // Vet. Microbiol. – 2000. – Vol. 74. – P. 3-13.
5. Guan Y., Shortridge K.F., Krauss S. et al. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. // J. Virol. – 2000. – Vol. 74. – P. 9372-9380.
6. Guo Y., Li J., Cheng X. et al. Discovery of humans infected by avian influenza A (H9N2) virus // Chin. J. Exp. Clin. Virol. – 1999. – Vol. 13. – P. 105-108.
7. Lin Y.P., Shaw M., Gregory V. et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 9654-9658.
8. Palmer D.F., Dowdle W. R., Coleman M. T. et al. Advanced Laboratory Techniques for influenza Diagnosis // US Department of Health, Education and Welfare Immunology Series No. 6. – Atlanta: Center for Disease Control, 1975. – P. 147-156.
9. Peiris M., Yuen K. Y., Leung C. W. et al. Human infection with influenza H9N2 // Lancet. – 1999. – Vol. 354. – P. 916-917.
10. Peiris J.S.M., Guan Y., Markwell D. et al. Cocirculation of Avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in Southeastern China: Potential for genetic reassortment? // J. Virol. – 2001. – Vol. 75. – P. 9679-9686.

Accepted in 19.11.2004.