

МОНИТОРИНГ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ В КАЗАХСТАНЕ

А.К. Бопи^{1,2} , З.Д. Омарова¹ , Р.А. Рыстаева¹ , А.Б. Тулендибаев¹ ,
Т.У. Аргимбаева¹ , Д.Ә. Әлібекова¹ , Н.А. Әубәкір¹ , Т.Т. Ермекбай¹ ,
А.А. Серикбай³ , М.Б. Орынбаев¹ , Х.Б. Абеуов¹ *

¹ РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК,
пгт. Гвардейский

² Кыргызский государственный университет им. И. Арабаева, г. Бишкек

³ Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы
abeuov_khairulla@mail.ru

Аннотация. В данной статье представлены данные мониторинговых исследований по гриппу птиц в северных регионах Казахстана. Сбор образцов от домашней и дикой птицы проводили в северных регионах региона Казахстана. Обнаружение и типирование вируса гриппа проводили методом ПЦР и секвенированием. Биологическую активность выделенных вирусов определяли на 9-10-ти суточных развивающихся куриных эмбрионах. В результате исследований установлено, что причиной заболевания и гибели домашних птиц в хозяйствах Акмолинской и Северо-Казахстанской области в 2021 году является грипп птиц. Вирус гриппа А/Н5N8 был обнаружен в образцах от домашних птиц, доставленных из хозяйств Акмолинской (53,8%) и Северо-Казахстанской (16,7%) областей, а также в образце от дикого гуся, обитавшей на озере Койбагар Костанайской области. Выделенные от диких и домашних птиц вирусы гриппа отнесены к субтипу А/Н5N8 к Кладе 2.3.4.4b по Евразийской линии II (Eurasian HPAIV H5N8 Lineage II). Распространение гриппа птиц в популяции дикой и домашней птицы в северных районах Казахстана требует от ветеринарных служб принятия мер по разработке эффективных мер контроля с учетом данных молекулярной эпидемиологии.

Ключевые слова: вирус; грипп птиц; субтип; ПЦР; изолят; активность

Введение

Среди инфекционных болезней, грипп занимает особое положение, что обусловлено чрезвычайной изменчивостью возбудителя [1]. Грипп типа А заразен как для людей, так и для животных, включая птиц, свиней, лошадей, китов и тюленей. Естественным хозяином и природным резервуаром большинства подтипов вируса гриппа А являются дикие птицы, преимущественно водоплавающие или околотовные.

Вирус гриппа типа А принадлежит семейству *Orthomyxoviridae*. Вирусы гриппа подразделяются на субтипы на основании антигенных различий в поверхностных гликопротеинах. На сегодняшний день известно 18 субтипов гемагглютинаина и 11 субтипов нейраминидазы, из них у птиц идентифицировано шестнадцать подтипов HA (H1-H16) и девять NA (N1-N9). Вирусы гриппа подтипов А/Н17N10 и А/Н18N11 выделены от летучих мышей и до настоящего времени от других видов хозяев не выделялись [2, 3]. Наиболее часто у них встречаются 24 комбинации гемагглютинаина и нейраминидазы: H1N1-H2N2-H2N3-H3N2-H3N8-H4N2-H4N4-H4N6-H4N8-H5N1-H5N2-H5N9-H6N1-H6N2-H6N5-H6N9

–H7N1–H7N2–H7N3–H7N7–H9N2–H9N8–H10N7–H11N9. 15 подтипов гриппа распространяются на птиц, одним из самых опасных подтипов является H5N1.

В настоящее время в природе высокопатогенные вирусы гриппа, которые приводят к острым клиническим заболеваниям у кур, индеек и других видов птиц, были связаны только с такими антигенными вариантами, как H5 и H7. Поскольку существует риск трансформации вирусов гриппа птиц низкой патогенности (НПГП) в высокопатогенный (ВПГП) в результате мутаций, все типы вирусов ВПГП H5/H7, выделенные от птиц, подлежат регистрации во Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ).

Анализ данных по высокопатогенному гриппу птиц в соседних странах показывает, что за последние 3 года на Евразийском континенте в странах имеющих контакты с Республикой Казахстан через перелетных птиц было зарегистрировано 1402 лабораторно подтвержденных случая гриппа среди птиц. 1131 из 1402 был вызван вирусом гриппа А/Н5N8. Также были зарегистрированы случаи гриппа А/Н5N1 (37), А/Н5N2 (113), А/Н5N4 (1), А/Н5N5 (84), А/Н5N6 (6), А/Н7N7 (3), также 39 случаев А/Н5 с неидентифицированной N. Наличие в регионе нескольких вариантов гриппа птиц с различной антигенной формулой угрожает птицеводству нашей страны.

Через территорию Казахстана проходят несколько миграционных путей, что может способствовать распространению вируса гриппа с пролетных путей Юго-Восточной Азии на европейский и североафриканский пролетные пути и наоборот. Дикие птицы, мигрирующие из Африки, Европы, Центральной и Юго-Восточной Азии были обнаружены в небольших озерах, расположенных на севере Казахстана [4]. Существует высокий риск заноса и распространения вируса гриппа дикими перелетными птицами.

Цель нашей работы – мониторинг гриппа птиц в Казахстане, выделение и изучение биологических свойств выделенных изолятов вируса.

Материалы и методы

В работе использовали биологические пробы от больных и павших птиц, доставленных из различных регионов Республики Казахстан с целью выяснения причины заболевания и гибели животных. Было проведено эпизоотологическое обследование хозяйств и отбор биологических образцов от больных и павших птиц. От диких птиц образцы собраны во время сезонной охоты.

Кровь отбирали из подкрыльцовой вены при помощи вакутайнера. Пробирки с кровью промаркировав отстаивали для свертывания крови, сыворотку отделяли в условиях ветеринарной лаборатории. Затем отстоявшиеся сыворотки сливали в криопробирки, маркировали и погружали в емкость с жидким азотом. Носоглоточные смывы отбирали тампонами. Затем, кончик тампона помещали в криопробирку и промаркировав переносили непосредственно в емкость с жидким азотом. У павших птиц отбирали кусочки легких и трахеи, помещали в криопробирки, которые после маркировки закладывали в жидкий азот. Транспортировку проб до НИИПББ осуществляли в жидком азоте.

Доставленные в НИИПБ пробы были подвергнуты комплексному вирусологическому исследованию.

Для этого использовали 9-10-дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ). Выделение вируса гриппа из суспензии образца проводили, согласно протоколам ВОЗЖ.

Для выделения РНК вируса гриппа птиц из биоматериалов использованы наборы “Viral RNA MiniKit” фирмы «QIAGEN», согласно инструкции изготовителя.

Обнаружение вируса гриппа птиц субтипа А/Н5 проводили постановкой ОТ-ПЦР-РВ набором OneStep RT-PCR Kit фирмы «QIAGEN». Типирование по нейраминидазе проводили в ОТ-ПЦР.

Биологическую активность вируса гриппа птиц определяли с использованием эмбрионов 9-суточного возраста, методом титрования аллантоисной жидкости, собранной после 4-го пассажа изолята А/Н5N8 вируса гриппа птиц в РКЭ. Определение наличия вируса гриппа птиц в РКЭ проводили при помощи реакции гемагглютинации (РГА) путем титрации пассажной вирусосодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ).

Наработанные ПЦР-продукты очищали с использованием набора QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany), согласно инструкции изготовителя.

Секвенирование ПЦР-продуктов проводили с использованием набора BigDye terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) на автоматическом анализаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems/HITACHI, Japan).

Результаты исследований

В июле-октябре 2021 года для исследований в РГП НИИПББ были доставлены образцы от домашних птиц собранные в хозяйствах Акмолинской, Северо-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областях, а также смывы от диких птиц, отобранные в Костанайской области. Все доставленные образцы были исследованы на наличие вируса гриппа А. В результате, проведенных исследований вирус гриппа А/Н5N8 был обнаружен в образцах от домашних птиц, доставленных из хозяйств Акмолинской (53,8%) и Северо-Казахстанской (16,7%) областей, а также вирус в образце дикого гуся, отстреленного на озере Койбагар Костанайской области (табл.1). Полученные данные свидетельствуют, что в 2021 году среди домашних и диких птиц в северных регионах нашей страны циркулировал высокопатогенный грипп птиц А/Н5N8.

Таблица 1 – Результаты ПЦР-исследований биологических образцов птиц доставленных из регионов РК

Место отбора образцов	Дата отбора	Вид птиц	Количество исследованных / количество положительных / % положительных	Субтип
Костанайская область	октябрь 2021	гусь дикий	10/1/10	А/Н5N8
Северо-Казахстанская область	октябрь 2021	курица	12/2/16,7	А/Н5N8
Восточно-Казахстанская область	октябрь 2021	курица	10/0/0	-
Акмолинская область	октябрь 2021	гусь домашний	1/1/100	А/Н5N8
	июль-октябрь 2021	курица	10/6/60	А/Н5N8
	октябрь 2021	индюк	2/0/0	-

Заражением 10-ти суточных развивающихся куриных эмбрионов из ПЦР положительных образцов кур доставленных из Акмолинской области были выделены гемагглютинирующие агенты, идентифицированные как вирус гриппа А/Н5N8. Биологические характеристики выделенных вирусов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Молекулярно-биологические характеристики вируса А/Н5N8

Название штамма	Дата выделения	Место выделения	Вид птицы	Биологическая активность AID50/см ³	Гемагглютинирующая активность, ГАЕ	Сайт расщепления	Генетическая линия
А/кураца/ Акмола/62/21 (H5N8)	07. 2021 г	Акмолинская область	Курица	9,45	1:128	PLREKRRKR/G	2.3.4.4b
А/дикий гусь/ Костанай/83/21 (H5N8)	10. 2021 г	Костанайская область	Дикий гусь	8,45	1:32	PLREKRRKR/G	2.3.4.4b
А/домашний гусь/ Акмола/65/21 (H5N8)	10. 2021 г	Акмолинская область	Домашний гусь	8,95	1:64	PLREKRRKR/G	2.3.4.4b
А/кураца/ СКО/97/21 (H5N8)	10. 2021 г	Северо-Казахстанская область	Курица	8,2	1:128	PLREKRRKR/G	2.3.4.4b

В результате анализа все выделенные вирусы по сайту расщепления с последовательностью PLREKRRKR/G были отнесены к высокопатогенному вирусу гриппа птиц (ВПГП). Филогенетический анализ выделенных изолятов по гемагглютинуину, позволил отнести их к Кладе 2.3.4.4b по Евразийской линии II (Eurasian HPAIV H5N8 Lineage II).

Обсуждение

Первые вспышки высокопатогенного гриппа птиц в Казахстане были зарегистрированы в 2005 году [5, 6]. Последние 15 лет в птицеводческих хозяйствах нашей страны вспышки высокопатогенного гриппа птиц не регистрировали. Эпизоотическое благополучие в птицеводческих хозяйствах Республики Казахстан поддерживалось благодаря интенсивной вакцинации птиц. Во многих хозяйствах отработаны схемы вакцинации для поддержания высокого количества поствакцинальных антител, которое требуется для обеспечения невосприимчивости птиц к вирусу гриппа А. Однако, несмотря на все проводимые мероприятия, в 2020 году вспышки гриппа птиц нанесли огромный ущерб птицеводству Казахстана. По данным КВКиН МСХ РК в 2020 году в нашей стране было зарегистрировано 98 случаев высокопатогенного гриппа птиц. В результате вспышек, ветеринарной службой нашей страны в Алматинской, Акмолинской, Северо-Казахстанской, Костанайской, Павлодарской, Карагандинской областях было вынуждено убито более 1,5 млн птиц. Очевидно, что эти вспышки связаны со вспышками гриппа птиц регистрируемых на Евразийском континенте. Анализ данных распространения гриппа А/Н5N8 на Евразийском континенте показывает, что вирус гриппа данного субтипа в 2019 г. был зарегистрирован в Афганистане (2 очага) и Иране (8), в 2020 г. в 6 странах было зарегистрировано 256 вспышек, в том числе в России 80 вспышек. В 2021 г. количество вспышек вызванных вирусом гриппа достигло 865 и охватило практически всю восточную и северную Европу, а также страны Азии. Вспышки регистрировались в течение всего года и нанесли серьезный экономический ущерб.

Данные полученные нами по результатам настоящих исследований показывают, что эпизоотия вируса гриппа птиц начавшаяся в 2020 г. до сих пор продолжается. Проведенными исследованиями было установлено, что вспышки гриппа в 2021 г. в Северо-Казахстанской и Акмолинской областях среди домашних птиц вызваны вирусом гриппа птиц А/Н5N8, который относится к кладе 2.3.4.4b по Евразийской линии II (Eurasian HPAIV H5N8 Lineage II). Ранее было показано, что основное количество вспышек в странах Европы, на Ближнем

Востоке и в Юго-Восточной Азии среди дикой и домашней птицы было вызвано вирусами гриппа подтипа А/Н5N8 клады 2.3.4.4b [7]. На основании полученных данных можно заключить, что вирус гриппа А/Н5N8 клады 2.3.4.4b в 2021 году циркулировал в популяции домашней и дикой птицы северных районов нашей страны. Обнаружение вируса гриппа А/Н5N8 у дикого гуся в Костанайской области позволяет предположить, что дикие птицы действуют как резервуары гриппа птиц и вспышки болезни среди домашней птицы в северных регионах Казахстана, возможно, связаны с миграциями диких птиц.

Заключение

Таким образом, результаты нашего исследования дают важные сведения об эпидемиологии гриппа у диких и домашних птиц в Казахстане. Эти данные расширят наши знания эпидемиологии, экологии и генетических взаимоотношений вирусов гриппа и помогут нам оценить риск передачи между домашней птицей и дикой птицей. Полученные данные подчеркивают необходимость постоянного наблюдения за основными миграционными путями в этом регионе. Мониторинг вирусов гриппа птиц и секвенирование генома идентифицированных вирусов могут сыграть важную роль для лучшего понимания межконтинентальной передачи вирусов гриппа и для раннего выявления новых появляющихся реассортантных штаммов. Выявление гриппа птиц в популяции дикой и домашней птицы в северных районах Казахстана требует от ветеринарных служб принятия мер по разработке эффективных мер контроля с учетом данных молекулярной эпидемиологии.

Финансирование: Работа выполнена в в рамках научно-технической программы «Биологическая безопасность Республики Казахстан: оценка угроз, научно-технические основы их предупреждения и ликвидации» на 2021-2023 годы, при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Конфликт интересов: Авторы заявляют, что нет конфликта интересов.

Литература

- 1 Webster R.G., Govorkova E.A. Continuing challenges in influenza // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2014. – 1323(1). – P.115–39.
- 2 Tong S., Li Y., Rivailler P., Conrardy C., Castillo D.A., Chen L.M., Recuenco S., Ellison J.A., Davis C.T., York I.A., Turmelle A.S., Moran D., Rogers S., Shi M., Tao Y., Weil M.R., Tang K., Rowe L.A., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K.A., Cox N.J., Anderson L.J., Rupprecht C.E., Donis R.O. A distinct lineage of influenza A virus from bats // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – 109(11). – P. 4269–74. DOI: 10.1073/pnas.1116200109.;
- 3 Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L.M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., McBride R., Carney P.J., Gilbert A.T., Chang J., Guo Z., Davis C.T., Paulson J.C., Stevens J., Rupprecht C.E., Holmes E.C., Wilson I.A., Donis R.O. New world bats harbor diverse influenza A viruses // *PLoS Pathog.* – 2013. – 9(10):e1003657. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003657
- 4 Wang G., Zhan D., Li L., et al. H5N1 avian influenza re-emergence of Lake Qinghai: phylogenetic and antigenic analyses of the newly isolated viruses and roles of migratory birds in virus circulation // *J. Gen Virol.* – 2008. – 89(Pt 3). – P. 697-702.
- 5 Burashev Y., Strochkov V., Sultankulova K., Orynbayev M., Kassenov M., Kozhabergenov N., Shorayeva K., Sadikaliyeva S., Issabek A., Almezhanova M., Nakhanov A., Savitskaya I., Zakarya K. Near-complete genome sequence of an H5N1 avian influenza virus strain isolated from a swan in Southwest Kazakhstan in 2006 // *Microbiol Resour Announc.* – 2020. – 9(13) e00016-20.
- 6 Issabek A., Burashev Y., Chervyakova O., Orynbayev M., Kydyrbayev Z., Kassenov M., Zakarya K., Sultankulova K. Complete genome sequence of the highly pathogenic strain A/domestic goose/Pavlodar/1/05 (H5N1) of the avian influenza virus, isolated in Kazakhstan in 2005 // *Microbiol Resour Announc.* – 2020. – 9(10):e00109-20.

- 7 Marchenko V.Yu., Goncharova N.I., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Ryzhikov A.B. Overview of the Epizootiological Situation on Highly Pathogenic Avian Influenza in Russia in 2020 // Problems of Particularly Dangerous Infections. – 2021. – Vol.2. – P.33–40.

ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ ЖОҒАРЫ ПАТОГЕНДІ ҚҰС ТҰМАУЫНЫҢ МОНИТОРИНГІ

А.К. Бопи^{1,2} , З.Д. Омарова¹ , Р.А. Рыстаева¹ , А.Б. Тулендибаев¹ ,
Т.У. Аргимбаева¹ , Д.Ә. Әлібекова¹ , Н.А. Әубәкір¹ , Т.Т. Ермекбай¹ ,
А.А. Серикбай³ , М.Б. Орынбаев¹ , Х.Б. Абеуов¹ *

¹ ҚР ДСМ «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМҚ,
Гвардейск құк

² И.Арабаев атындағы Қырғыз мемлекеттік университеті, Бішкек қ.

³ әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы қ.

Аннотация. Бұл мақалада Қазақстанның солтүстік өңірлеріндегі құс тұмауы бойынша жүргізілген мониторингтік зерттеулердің нәтижелері ұсынылған. Үй және жабайы құстардан сынамалар алу Қазақстан облысының солтүстік аймақтарында жүргізілді. Тұмау вирусын анықтау және типтеу ПТР және секвенирлеу арқылы жүзеге асырылды. Бөлінген вирустардың биологиялық белсенділігі 9-10 күндік дамып келе жатқан тауық эмбриондарында анықталды. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде 2021 жылы Ақмола және Солтүстік Қазақстан облыстарының шаруашылықтарында құстардың ауруға шалдығулары мен өлімдерінің себепкері құс тұмауы екені анықталды. А/Н5N8 тұмауының вирусы Ақмола (53,8%) және Солтүстік Қазақстан (16,7%) облыстарының шаруашылықтарынан жеткізілген құстардың сынамаларынан, және де Қостанай облысындағы Қойбағар көлінде мекендеген жабайы қаздың сынамасынан табылды. Жабайы және үй құстарынан оқшауланған тұмау вирустары еуразиялық II (Eurasian HPAIV H5N8 Lineage II) бойынша 2.3.4.4b Кладасына А/Н5N8 қосалқы түрі ретінде жіктеледі. Қазақстанның солтүстік облыстарындағы жабайы және үй құстары популяциясы арасында құс тұмауының таралуы ветеринариялық қызметтерден молекулярлық эпидемиологиялық деректер негізінде тиімді күрес шараларын әзірлеу бойынша шаралар қабылдауды талап етеді.

Кілт сөздер: вирус; құс тұмауы; субтип; ПТР; изолят; белсенділік

MONITORING OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA IN KAZAKHSTAN

А.К. Бопи^{1,2} , З.Д. Омарова¹ , Р.А. Рыстаева¹ , А.Б. Тулендибаев¹ ,
Т.У. Аргимбаева¹ , Д.А. Алібекова¹ , Н.А. Аубакір¹ , Т.Т. Ермекбай¹ ,
А.А. Серикбай³ , М.Б. Орынбаев¹ , Х.Б. Абеуов¹ *

¹ Research Institute for Biological Safety Problems, Ministry of Healthcare of the Republic of
Kazakhstan, Gvardeisky

² Kyrgyz State University named after I. Arabaeva, Bishkek

³ Kazakh National University named after al-Farabi, Almaty

Annotation. This article presents data from monitoring studies on avian influenza in the northern regions of Kazakhstan. Collection of samples from domestic and wild birds was carried out in the northern regions of the Kazakhstan. Detection and typing of the influenza

virus was carried out by PCR and sequencing. The biological activity of the isolated viruses was determined on 9-10 day old developing chicken embryos. As a result of the research, it was found that the cause of illness and death of birds in the farms of the Akmola and North Kazakhstan regions in 2021 is an avian influenza. Influenza A/H5N8 virus was found in samples from poultry delivered from farms in Akmola (53.8%) and North Kazakhstan (16.7%) regions, as well as in a sample from a wild goose that lived on Lake Koybagar in Kostanay region. Influenza viruses isolated from wild and domestic birds are classified as subtype A/H5N8 to Clade 2.3.4.4b along the Eurasian line II (Eurasian HPAIV H5N8 Lineage II). The spread of avian influenza in the population of wild and domestic birds in the northern regions of Kazakhstan requires the veterinary services to take measures for developing effective control measures based on molecular epidemiology data.

Key words: virus; avian influenza; subtype; PCR; isolate; activity