

УДК 578.832.1:578.4

М.Х. САЯТОВ, А.И. КЫЦЫРМАНОВ, К.Х. ЖУМАТОВ, Н.Г. ИШМУХАМЕТОВА,
К.Д. ДАУЛБАЕВА, К.О. КАРАМЕНДИН, С.Е. АСАНОВА, Л.И. ШАХВОРОСТОВА

АНТИГЕННЫЙ СПЕКТР ВИРУСОВ ГРИППА, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СРЕДИ ДИКИХ И ДОМАШНИХ ПТИЦ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

Введение

Грипп является самым массовым инфекционным заболеванием вирусной этиологии, который представляет большую угрозу общественному здравоохранению, сельскому хозяйству и наносит огромный экономический урон.

Причина глобального неконтролируемого распространения гриппозной инфекции заключается в уникальной изменчивости возбудителя, которая может быть результатом как мутаций, так и рекомбинаций и реассортаций генов. Такое многообразие путей генетической вариабельности, в свою очередь, объясняется молекулярно-биологическими особенностями структуры вирусной частицы. Вирусы гриппа А обладают сегментированным геномом в виде негативной линейной РНК, и разделяются на основе антигенных свойств поверхностных гликопротеидов - гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА), К настоящему времени идентифицировано 16 подтипов НА и 9 подтипов НА, которые обнаруживаются во многих различных сочетаниях [1, 2, 3]. Вирусы гриппа А, помимо человека, изолированы от широкого круга хозяев, включая свыше 90 видов птиц и различные виды млекопитающих, такие, как свиньи, лошади, норки, ондатры, морские животные [4, 5, 6].

Орнитофауна играет основную роль в процессе эволюции и сохранения вируса гриппа А в биосфере и является потенциальным источником эпидемически актуальных вариантов. Представители отрядов *Anseriformes* (утки, гуси и лебеди) и *Charadriiformes* (прибрежные виды вместе с чайками) формируют его естественный резервуар, из которого может происходить трансмиссия возбудителя к другим хозяевам. В настоящее время общепризнано, что глобальное сложение за вирусом гриппа в орнитофауне может сыграть ключевую роль в раннем распознавании угрозы пандемии и подготовке к ней.

В связи с тем, что Казахстан занимает уни-

кальное географическое положение в центре Евразии и через его огромную территорию проходят трансконтинентальные миграционные пути диких птиц, являющихся потенциальными источниками эпидемических вариантов вируса гриппа, изучение экологии и эволюции возбудителя самой массовой и непредсказуемой инфекции птиц и человека является актуальной задачей.

Материалы и методы

В период с 1978 по 2008 гг. исследовано более 3000 образцов от диких птиц водного, околоводного и наземного комплексов. Для изоляции вирусов использовали трахеальные и клоакальные смывы, а также образцы различных органов от больных и погибших птиц. Изоляцию и клонирование гемагглютинирующих агентов (ГАА) проводили на 10-11 дневных куриных эмбрионах (КЭ).

Принадлежность изолятов к орто- и парамиксовирусам определяли с помощью азотистой кислоты [7].

Для первичной идентификации ГАА использовали коммерческую тест-систему Directigen Flu A фирмы Becton Dickinson (Sparks, США).

Определение подтипа НА изолятов проводили микрометодом в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием набора диагностических сывороток к вирусам гриппа А с различными сочетаниями поверхностных антигенов, предоставленный д-ром M. Lipkind (Израиль) и референсной лабораторией ВОЗ по гриппу в Вейбридже (Англия). Для удаления неспецифических ингибиторов иммунные сыворотки обрабатывали рецепторразрушающим энзимом (RDE) из неочищенного фильтрата *V. Cholerae* (Denka Seiken Co., Ltd. Tokyo, Japan). К одной части неразведенной сыворотки добавляли три объема RDE. Смесь оставляли при +37°C в течение 18 ч., затем прогревали при температуре +56°C в течение 30 мин., после чего добавляли шесть частей физиологического раствора для

получения конечного разведения сыворотки 1:10.

Идентификацию подтипа НА изолятов вируса гриппа проводили в реакции ингибиции нейраминидазной активности (РИНА) согласно рекомендации ВОЗ (Dowdal et al. 1979). Для этого использовали набор моноспецифических диагностических сывороток к НА вируса гриппа А подтипов N1-N9, любезно предоставленных д-ром M. Lipkind (Израиль). Сыворотки предварительно разводили 1:10 в забуференном физиологическом растворе (рН 7,2) и прогревали при +56°C в течение 30 мин.

Результаты и обсуждение

Исследования по экологии вирусов гриппа А в популяциях диких и домашних птиц проводили в Южном и Юго-Восточном, Западном и Центральном Казахстане.

Южный и Юго-Восточный Казахстан. В 1978-1980 гг. по заданию ГКНТ при Совете Министров СССР выполнялись исследования по теме: «Изучить роль перелетных птиц в циркуляции вирусов гриппа А в Казахской ССР». В эти годы в период весенне-осенних миграций и пребывания птиц в местах гнездования в Джамбулской (Чокпакский перевал в Западном Тянь-Шане), Алматинской (озера Алаколь, Сасыкколь, Сорбулак, ущелье Жаманты в предгорьях Заилийского Алатау) областях и окрестностях г. Алматы были собраны биопробы от 1773 диких птиц. При их вирусологическом исследовании выделено 52 изолята вируса гриппа, из которых 42 имели антигенную формулу A(H10N5), 10 – A(H1N1). Вирусы гриппа A(H10N5) изолированы от диких птиц, относящихся к девяти отрядам. Вирусы подтипа A (H1N1), в антигенном отношении сходные с эпидемическими вирусами 1950-1952 гг. и 1977-1978 гг., выделены от чаек (озерных и серебристых), чирков-трескунков, лысух, юрков, широконосок и ворон [8, 9].

В августе 2004 г. в шести различных участках побережья озера Алаколь собрано 55 биопроб (трахеальные и клоакальные смывы) от 39 особей 15 видов диких птиц и восьми особей домашних птиц приусадебного содержания. В результате инфицирования 10-11 дневных КЭ выделено четыре ГАА, идентифицированные в РТГА и РИНА как вирусы гриппа А подтипа H4N6. Изоляты, впервые выделенные на территории Казахстана от лысухи, малой поганки, плосконосого плавунчика и красноносого нырка, про-

явили близкое антигенные родство с эталоном A/утка/Чехословакия/1/56 (H4N6) [10].

В октябре 2008 г. во время коротких миграционных остановок диких птиц в Южно-Казахстанской области (оз. Кзылколь, Созакский район) от утиных (Сем. Anatidae) собрано 34 биологических образца. В ходе первичного заражения и двух последовательных пассажей на КЭ выделено 13 ГАА, пять из которых определены при помощи тест-системы Directigen Flu A как вирусы гриппа серотипа А. По данным РТГА и РИНА, все изоляты, выделенные от чирка-свистунка, отнесены к вирусам гриппа А подтипа H3N8.

В Юго-Восточном Казахстане штаммы вируса гриппа А изолированы также и от домашних птиц. В марте 1987 г. в птицеводческом хозяйстве, расположенном в Алматинской области, в период локальной вспышки острой респираторной инфекции из внутренних органов погибших уток выделены два ГАА, идентифицированные как вирусы гриппа A(H7N1) и A(H7N7). Штаммы проявили родство с вирусами A/FPV/Росток/34 (H7N1), A/лошадь/Прага/56 (H7N7) и A/тюлень/Массачусетс/1/80 (H7N7). Однако иммунологический анализ, проведенный с серией моноклональных антител к вирусу A/тюлень/Массачусетс/1/80 (H7N7), выявил значимые антигенные различия в структуре их НА. Вариабельность антигенных свойств и высокая вирулентность казахстанских изолятов, по-видимому, и явилась причиной 80% летальности птиц в этом хозяйстве [11].

В 2004 г. в частном хозяйстве в пригороде г. Алматы из проб легких от больных и павших индеек выделены два изолята вируса гриппа с антигенной формулой H11N9 – A/индюк/Алматы/535/04 и A/индюк/Алматы/536/04 [12, 13]. Вирусы оказались антигенно идентичными, так как в равных титрах взаимодействовали друг с другом в перекрестной РТГА и близкими по основным биологическим свойствам.

Центральный Казахстан. Во время осенних миграций в 2004 и 2006 гг. в Тенгиз-Коргалжынской системе озер собрано 202 полевых материала от диких водоплавающих птиц девяти видов. Из клоакальных смывов изолировано 12 ГАА, из которых четыре идентифицированы как вирусы H3N6, шесть – H3N8 и два – H4N6. Изоляты с подтипом НА Н3, выделенные от кряквы, шилохвости, чирка-трескунка, речной крач-

ки, серого гуся, сизой чайки, красноносого нырка и свиязи в РТГА проявляли близкое антигенные родство с вирусами эталонами A/утка/Украина/63 (H3N8) и A/лошадь/Майами/1/63 (H3N8), а вирусы H4N6, изолированные от огаря и чирка-свистунка – с референсным вариантом A/утка/Чехословакия/1/56 (H4N6) [10].

Западный Казахстан. С 2002 по 2008 гг. на побережье и островах Северного и Восточного Каспия, в дельте реки Урал во время весенне-осенних миграций, периода гнездования, а также зимовки птиц собрано 1060 биологических образцов в виде клоакальных и трахеальных смывов от 970 особей 46 видов птиц, принадлежащих к 15 семействам 10 отрядов. В результате вирусологических исследований выделено 58 изолятов вируса гриппа А. Все они получены только из клоакальных смывов. Из смывов трахеи не удалось выделить какие-либо ГАА, даже в случае успешной изоляции их из проб клоаки у одной и той же птицы. Вирусы гриппа А выделены от представителей четырех отрядов (поганкообразных, пластинчатоклювых, журавлеобразных, ржанкообразных) из 10 исследованных.

В 2002 и 2004 гг. из 185 полевых материалов, собранных от диких птиц, изолировано 19 ГАА, идентифицированные в РТГА и РИНА как вирусы гриппа А подтипа H13N6. Наибольшее их количество (15 из 19) выделено от черноголового хохотуна, что составило 78,9% изолятов. В 2003 и 2005 гг. исследована 281 биопроба, однако изолировать ГАА не удалось.

В 2006 г. от лысухи, голубой и хохлатой чернети выделены изоляты вируса гриппа А подтипа H4N6. Большой интерес вызывает изоляция в это же время высокопатогенного штамма вируса гриппа птиц А (H5N1) от погибшего лебедя-шипуна, что еще раз подтверждает необходимость проведения постоянного мониторинга возбудителя гриппа в орнитофауне для своевременного выявления эпизоотически значимых вариантов вируса.

В апреле 2007 г. в регионе Северного Каспия, впервые в Казахстане от чаек и пеганки выделены пять изолятов вируса гриппа А (H2N2); от серой утки, поганки и лысухи четыре - H16N3. Выделение вируса гриппа А (H2N2) вызывает особый интерес, так как после пандемии «азиатского гриппа» 1957-1967 гг. не установлена их циркуляция в популяциях диких птиц на огромной

территории бывшего СССР. Важным также представляется факт изоляции в Казахстане вируса гриппа с подтипов НА H16. Первые сведения о выявлении вируса гриппа с этим новым подтипов НА, циркулировавшего среди озерных чаек в Скандинавии, опубликованы только в 2006 г. [3].

В июле 2008 г. из биопроб, взятых от диких птиц, обитающих на северном побережье Каспия, выделено 26 ГАА. Наибольшее их количество (20 ГАА) выделено от черноголового хохотуна. Другие виды включают большую поганку, лебедя шипуна, квакву, серую ворону, белокрылую крачку, красноносого нырка. Все изоляты при идентификации отнесены к вирусам гриппа А подтипа H13N6.

Результаты многолетних исследований по изоляции вирусов гриппа А от диких и домашних птиц в различных регионах Казахстана обобщены в сводной таблице (таблица).

Как видно из таблицы, в результате экологово-вирусологического мониторинга возбудителей гриппа среди диких и домашних птиц на территории Казахстана в период с 1978 по 2008 гг. выделено 135 изолятов вируса гриппа А с подтипами НА - H1, H2, H3, H4, H5, H7, H10, H11, H13 и H16 и НА - N1, N2, N3, N5, N6, N7, N9 в 12 различных антигенных сочетаниях.

Широкая распространность вирусов гриппа различных подтипов в Республике создает потенциальную возможность возникновения эпидемически и эпизоотически опасных вариантов возбудителей и объясняет важность проведения постоянного контроля за циркуляцией вирусов гриппа в популяциях диких птиц.

ЛИТЕРАТУРА

1 WHO. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum // Bull. WHO.-1980.- Vol. 58.- P. 585-591.

2 Cox N.J., Fuller F., Kaverin N. et al. Virus Taxonomy // Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego.-2000.- 1024 pp.

3 Fouchier R.M., Munster V., Wallensten A. et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls // J Virol.- 2005.- Vol. 79, №5.- P. 2814-2822.

4 Hinshaw V.S., Bean W.J., Webster R.G. Are seals frequently infected with avian influenza viruses? // J.- Virol.- 1984.-Vol. 51. P. 863-865.

5 Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses // Microbiol. Rev.-1992.- Vol. 56.- P. 152-179.

Таблица. Изоляция вирусов гриппа А от диких и домашних птиц в различных регионах Казахстана

Год	Подтип вируса	Коли-чество изоля-тов	Вид птиц	Место сбора материала
1979	H1N1	4	лысуха; чирок-трескунок; широконоска; озерная чайка	Алматинская область (оз. Сорбулак, оз. Алаколь)
	H10N5	29	лысуха; чирок-трескунок; другие виды птиц	
1980	H1N1	6	домовой воробей; юрок; серая ворона	Алматинская область (оз. Сорбулак), окрестности г. Алматы
	H10N5	13	домовой воробей; полевой воробей; серая ворона; другие виды птиц	
1987	H7N1	1	домашняя утка	пригород Алматы
	H7N7	1		
2002	H13N6	8	чеграва; серебристая чайка; черноголовый хохотун	Атырауская область (Северный Каспий)
	H3N6	2	речная крачка; чирок-трескунок	Акмолинская область (Коргалжынский заповедник)
2004	H4N6	4	лысуха; малая поганка; плоско-носый плавунчик; красноносый нырок	Алматинская область (оз. Алаколь)
		1	огарь	Акмолинская область (Коргалжынский заповедник)
	H11N9	2	индейка	пригород Алматы
	H13N6	11	черноголовый хохотун	Атырауская область (Северный Каспий)
	H3N6	2	серый гусь	Акмолинская область (Коргалжынский заповедник)
2006	H3N8	6	чирок-свистунок; сизая чайка; красноносый нырок; свиязь	Акмолинская область (Коргалжынский заповедник)
		3	лысуха; голубая чернеть; хохлатая черенеть	Мангистауская область (Восточный Каспий)
	H4N6	1	чирок-свистунок	Акмолинская область (Коргалжынский заповедник)
	H5N1	1	лебедь шипун	Мангистауская область (Восточный Каспий)
2007	H2N2	5	серебристая чайка; озерная чайка	Атырауская область (Северный Каспий)
	H16N3	4	серая утка; серебристая чайка; лысуха; пеганка	
2008	H3N8	5	чирок-свистунок	Южно-Казахстанская область (оз. Кзылколъ, Созакский район)
	H13N6	26	большая поганка; черноголовый хохотун; лебедь шипун; кваква; серая ворона; белокрылая крачка; красноносый нырок	Атырауская область (Северный Каспий)
Итого:		135		

6 *Лъвов Д.К., Ямникова С.С., Федякина И.Т. и др. Экология и эволюция вирусов гриппа в России (1979-2002 гг.)*
// Вопр. Вирусол.-2004.- №3.- С. 17-24.

7 *Сафонов Г.А., Володина Л.И. Способ дифференциальной диагностики ортомиксовирусных и парамиксовирусных возбудителей болезней птиц // Описание изобретения к авторскому свидетельству №539073. - Опубликовано 15.12.76.- Бюллетень № 6.*

8 *Саятов М.Х. Экология и иммунология вирусов гриппа А (H1N1), циркулирующих среди диких птиц и населения Казахской ССР. // Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. М.-1986.-45 с.*

9 *Саятов М.Х., Бейсембаева Р.У., Лъвов Д.К. и др. Изучение вирусов гриппа, выделенных от диких птиц // Вопр. Вирусол.-1981.- №4.- С. 466-471.*

10 *Бутакова И.Ш., Богомолова Т.С., Саятов М.Х. и др. Выделение вирусов гриппа А сероподтипов H3N6 и H4N6 в РК в 2004 году // Поиск.- 2007.- № 1.- С. 108-112.*

11 *Даулбасаева К.Д., Шайхинова Т.Б., Ямникова С.С. и др. Характеристика вирусов гриппа А, выделенных от домашних уток в Казахской ССР // Изв. АН КазССР. Сер. биол.-1990.- № 1.- С.60-64.*

12 *Саятов М.Х., Кыдырманов А.И., Ишмухаметова Н.Г. Высокопатогенный грипп птиц. Ситуация в мире и в Казахстане // Биотехнология. Теория и практика. – 2006 - №2. – С. 5-13.*

13 *Жуматов К.Х., Кыдырманов А.И., Ишмухаметова Н.Г. и др. Характеристика штаммов вируса гриппа А*

(H11N9), выделенных от домашних птиц в РК в 2004 г. // Поиск – 2007 - №1. – С. 117 – 120.

Резюме

1978–2008 жылдары Оңтүстік, Оңтүстік-Шығыс, Батыс және Орталық Қазақстанның жабайы және үй құстарындағы грипп А вирусына мониторинг жүргізу нәтижелері көрсетілген. Үш мыңдан артық биологиялық сынаманы вирусологиялық зерттеуден өткізгенде, грипп А вирусының 10 типтармасына жататын антигендік үйлесімі 12 түрлі (H1N1, H2N2, H3N6, H3N8, H4N6, H5N1, H7N1, H7N7, H10N5, H11N9, H13N6, H16N3) 135 штаммы бөлініп алынды.

Summary

The results of monitoring of avian influenza A viruses among wild and domestic birds in Southern, South-Eastern, Western and Central Kazakhstan in 1978-2008 are presented in this paper. More than 3000 biological samples were tested in virological investigations and 135 strains of influenza A virus of 10 subtypes in 12 different antigenic combinations (H1N1, H2N2, H3N6, H3N8, H4N6, H5N1, H7N1, H7N7, H10N5, H11N9, H13N6, H16N3) were isolated.

ДГП Институт микробиологии и вирусологии,
г. Алматы, Казахстан

Поступила 5.06.09