

Биология

УДК 578: 578.74: 578.28

DOI: 10.52754/16947452\_2022\_3\_62

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПАТОГЕННОСТЬ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ КАЗАХСТАНА**

*Табыс Шалкар Толегенулы, старший лаборант  
Кожабергенов Нурлан Сиязбекович,  
старший научный сотрудник  
Кошеметов Жумагали Каукарбаевич,  
доктор биологических наук, профессор koshemetov2008@mail.ru  
Жугунисов Куандык Даулетбаевич, PhD  
НИИ проблем биологической безопасности,  
Гвардейский, Казахстан*

***Аннотация.** В данной работе представлены результаты исследований по идентификацию и изучению патогенности коллекционных изолятов вируса гриппа птиц, выделенных на территории Казахстана, которые собраны во время мониторинговых исследований в 2002-2003 годы. В результате работы по типированию были установлены, что 6 изолятов из 7 исследуемых проб относятся к субтипу H13 в РТГА, которые в последующим подтверждены методом ОТ ПЦР. При этом в РТГА одна проба показала перекрестные результаты к субтипу H1 и вирусу болезни Ньюкасла, что подтверждает контаминацию этой пробы. Далее при тестировании этих проб на белок нейраминидазы методом ПЦР было установлено, что они принадлежат к подтипу N6. При изучении патогенности изолятов в отношении птиц установлено, что испытанные изоляты вируса гриппа птиц являются слабопатогенными.*

***Ключевые слова:** грипп птиц, субтип, ПЦР, РТГА, нейраминидаза*

## **КАЗАКСТАН ТЕРРИТОРИЯСЫНДАГЫ КАНАТТУУЛАР ТУМООСУ ВИРУСУ КОЛЛЕКЦИЯСЫНЫН ИСОЛАТТАРЫН АНЫҚТОО ЖАНА ПАТОГЕНДИЛГИ**

*Табыс Шалкар Толегенулы, улук лаборанты  
Кожабергенов Нурлан Сиязбекович, улук илимий кызматкери  
Кошеметов Жумагали Каукарбаевич, биол. и. д., профессор  
koshemetov2008@mail.ru  
Жугунисов Куандык Даулетбаевич, PhD  
Биологиялык коопсуздук проблемалары боюнча ИИИ,  
Гвардейский, Казакстан*

**Аннотация.** Бул эмгекте 2002-2003-жылдары мониторинг изилдөөлөрүндө чогултулган Казакстанда бөлүнүп алынган канаттуулар тумоосунун вирусунун коллекциялык изоляттарынын патогендүүлүгүн аныктоо жана изилдөө боюнча изилдөөлөрдүн натыйжалары берилген. Терүү иштеринин натыйжасында изилденген 7 үлгүнүн ичинен 6 изолят РТГАдагы H13 субтипине таандык экени аныкталган, алар кийинчерээк ОТ-ПЦР менен тастыкталган. Ошол эле учурда, РТГАда бир үлгү H1 субтипи жана Ньюкасл оорусу вирусу үчүн кайчылаш натыйжаларды көрсөттү, бул үлгүнүн булганышын тастыктайт. Андан ары, бул үлгүлөрдү нейраминидаза протеинине ПЦР аркылуу сынап көргөндө, алар N6 түрүнө таандык экени аныкталган. Канаттууларга карата изоляттардын патогендүүлүгүн изилдөөдө канаттуулардын тумоосу вирусунун текшерилген изоляты начар патогендүү экени аныкталган.

**Ачкыч сөздөр:** канаттуулар тумоосу, субтип, полимераздык чынжыр реакциясы, гемагглютинацияны бөгөт коюу реакциясы, нейраминидаза.

## IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF AVIAN INFLUENZA VIRUS COLLECTION ISOLATES OBTAINED ON THE TERRITORY OF KAZAKHSTAN

*Tabys Shalkar Tolegenuly, senior laboratory assistant  
Kozhabergenov Nurlan Siyazbekovich, Senior Researcher  
Koshemetov Zhumagali Kaukarbaevich, Doctor of Biological Sciences, Professor  
Kuandyk Dauletbaevich Zhugunisov, PhD  
Research Institute for Biological Safety Problems,  
Gvardeyskiy, Kazakhstan*

**Abstract.** *This paper presents the results of studies on the identification and study of the pathogenicity of avian influenza virus collection isolates obtained on the territory of Kazakhstan, which were collected during monitoring studies in 2002-2003. As a result of the typing work, it was established that 6 isolates out of 7 studied samples belong to the subtype H13 in hemagglutination inhibition assay (HAI), which were subsequently confirmed by the method of RT PCR. At the same time, one sample in HAI showed excellent results for the H1 subtype and the Newcastle disease virus, which confirms the contamination of this sample. Further, when testing these samples for the neuraminidase protein by PCR, it was found that they belong to the N6 subtype. During the study of the pathogenicity of isolates in relation to birds, it was found that the tested isolates of the avian influenza virus are weakly pathogenic.*

**Key words:** *avian influenza, subtype, PCR, HAI, neuraminidase*

**Введение.** Птичий грипп, классическая чума птиц – острая инфекционная вирусная болезнь птиц, вызываемая одним из штаммов вируса гриппа типа (ВГП) А, характеризующаяся поражением органов дыхания и пищеварения [1]. Вирусы гриппа А принадлежат к семейству

*Orthomyxoviridae* [2] и подразделяются на подтипы на основе состава двух поверхностных гликопротеинов: гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА). К настоящему времени идентифицировано в общей сложности 18 подтипов НА и 11 подтипов НА, из которых только 3 НА и 2 НА циркулируют в человеческой популяции в 4 комбинациях (H1N1 - «Испанский», H2N2 – «Азиатский», H3N2 – «Гонконгский» и H1N1 pdm09 – «Свиной») [3].

Природным резервуаром вирусов гриппа А являются дикие водоплавающие птицы из отрядов *Anseriformes* (гусы, утки) и *Charadriiformes* (кулики, чайки) [4], которые способны играть важную роль в эпидемиологии низкопатогенных ВГП. Вирусы гриппа А также могут инфицировать различные виды млекопитающих, включая людей, лошадей, свиней, кошек, собак и даже некоторых морских млекопитающих [5]. Кроме того, новая линия вирусов гриппа А была недавно идентифицирована у летучих мышей в Гватемале и Перу [6], что указывает на существование других естественных резервуаров вируса. Тем не менее, механизмы, позволяющие некоторым вирусам гриппа А преодолевать межвидовой барьер, до конца не изучены [7].

В последние годы эпизоотическая обстановка в мире по гриппу птиц значительно ухудшилась. По данным Всемирной организации здравоохранения животных с 2019 года по 2022 год в хозяйствах ряда азиатских, африканских, европейских стран, в Америке и Австралии зарегистрированы массовые заболевания, вызванные высоко патогенным вирусом гриппа А [8].

Казахстан расположен на пути миграции птиц из Китая в Евразию через Джунгарские ворота: озера Алаколь, Сасыкколь, а также вдоль реки Черный Иртыш, озер Зайсан, Маркаколь, реки Иле, водохранилища Капчагай, озера Балхаш, что предполагает возможную передачу в этих регионах вируса гриппа от птиц к свиньям, а от свиней к человеку.

Осенью 2020 года в Казахстане произошла крупная вспышка по птичьему гриппу в которой пало около 2 млн голов птиц. При проведении полногеномного секвенирования вирусов, собранных во время вспышек в Казахстане установлено, что вирусы относятся к подтипу А/Н5N8 и к клайде гемагглютинина H5 2.3.4.4b [9]. Полученные данные подтверждают занос в Казахстан высокопатогенных ВГП линии A/Goose/Guangdong/96 (Gs/GD) H5. Этот вирус представляет реальную угрозу для здоровья населения.

Данное положение требует своевременного принятия оперативных мер по локализации очага инфекции и предупреждению его распространения на близлежащие территории, в частности наложить карантин и своевременно купировать очаг инфекции. Для борьбы с указанной инфекцией необходимо правильно организовать профилактические мероприятия и наладить производство диагностических и вакцинных препаратов против таких болезней. Производство биопрепаратов невозможно без полноценного функционирования банка клеточных культур и коллекции микроорганизмов, в которых должна проводиться научно-производственная работа по их поддержанию и хранению. В связи с этим в данной работе нами были проведены работы по освежению и идентифицированию коллекционных изолятов ВГП, которые были собраны во время мониторинговых исследований в 2002-2003 гг. на территории Казахстана из проб, отобранных у миграционных водоплавающих птиц и изучены их патогенности на цыплятах.

**Материалы и методы исследования.** *Изоляты вирусов гриппа птиц.* В данной работе были использованы следующие изоляты ВГП: 234/02, 280/02, 279/02, 27/02, 230/02, 244/02, 272/02, А/745, выделенные в 2002-2003 годах на территории Казахстана.

*Освежение и культивирование вируса гриппа птиц на куриных эмбрионах.* Для освежения/культивирования вируса использовали развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) 9 сут возраста. Заражение и культивирование РКЭ вирусом гриппа птиц проводили по общепринятой методике [10].

*Определение биологической активности вируса гриппа птиц на куриных эмбрионах.* Биологическую активность изолятов ВГП определяли титрованием на 10-суточных РКЭ согласно установленной методике [11]. Для этих целей готовили десятикратные разведения вирусосодержащего материала на поддерживающей среде и стерильном 0,01 М ФСБ (рН 7,2-7,4). Каждым разведением вирусосодержащего материала, начиная с наивысшего ( $10^{-10}$ ), инфицировали по 4 РКЭ в аллантоисную полость в объеме 0,1 см<sup>3</sup>. Зараженные и контрольные эмбрионы инкубировали в вертикальном положении при температуре  $(35 \pm 0,5)$  °С с относительной влажностью воздуха  $(65 \pm 5)$  % в течение 48 часов и ежедневно овоскопировали. Индикацию репродукции штамма ВГП в аллантоисной жидкости

осуществляли в РГА. Биологическую активность изолятов вируса рассчитывали по методу L. Reed & H. Muench [12] и выражали в ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

*Гемагглютинирующую активность* изолятов вируса ВГП определяли в РГА с использованием 1%-ных взвесей эритроцитов петуха согласно методике [8].

*Заражение птиц.* Для экспериментального изучения патогенности исследуемых изолятов ВГП использовали клинически здоровых цыплят 3-4 мес возраста, не содержащих в крови антигемагглютинирующие антитела против данного типа вируса. Определение степени патогенности свежего материала, заключалось в интраназальном введении цыплятам 3-4 месячного возраста вируса гриппа в дозе 100000 ЭИД<sub>50</sub>/0,5 мл. После инфицирования вели наблюдение за всеми цыплятами с ежедневным измерением температуры тела в течение 14 сут.

*Идентификация изолятов вируса гриппа с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА).* Для идентификации изолятов ВГП были использованы специфические сыворотки к различному подтипу (H1N1, H2N2, H3N8, H4N6, H5N3, H6N2, H7N7, H8N4, H9, H10N7, H11N9, H12N5, H13N6, H14N1, H15N8) вируса гриппа (производитель Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Казахстан) и к вирусу болезни Ньюкасла. При идентификации изолятов вируса гриппа также были использованы следующие растворы: буферно-солевой раствор (ФБС) pH 7,2±0,2, раствор двузамещенного натрия Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, раствор однозамещенного натрия NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, раствор хлористого натрия (NaCl), раствор Альсевера.

Для постановки РТГА используют эритроциты петухов. Кровь у петухов берут из сердца или подкрыльцовой вены. Перед постановкой РТГА определяли гемагглютинирующий титр и рабочие дозы антигена согласно общепринятой методике [13].

*Выделение РНК вирусов.* РНК вирусов экстрагировали из вирусосодержащего материала в условиях лаборатории BSL-2 набором QIAamp Viral RNA Mini Kit (50) фирмы Qiagen в соответствии с инструкцией производителя.

*Постановка ОТ ПЦР.* ПЦР проводили с использованием термоциклера Mastercycler X50s, Eppendorf. Результаты амплификации ОТ ПЦР выявляли с помощью метода гель-электрофореза и гель документирующей системы BioRad. Электрофорез проводили при силе тока 400 mA в 2 % агарозном геле

в буфере TAE с добавлением SYBR Safe DNA gel stain, Invitrogen. Для оценки молекулярного веса фрагментов использовали маркеры молекулярного веса GelPilot 100 bp Plus Ladder, Qiagen.

*Статистическая обработка экспериментальных данных.* Все исследования проводили с числом повторностей, обеспечивающих получение достоверных результатов. Полученные результаты исследования обрабатывали математически. Подсчет среднего арифметического значения ( $\bar{X}$ ) и средней квадратической ошибки ( $m$ ) проводили с помощью GraphPad Prism8. Достоверность различий между показателями ( $P < 0,05$ ) определяли с применением критерия Стьюдента.

**Результаты.** *Освежение изолятов ВГП на РКЭ.* Перед освежением изолятов определяли гемагглютинирующую активность. В результате реакции установлена активность изолятов, которая составила от 1:2 до 1:64. После чего проведены три последовательного пассажа в РКЭ. Суммарные результаты исследований представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Биологическая и гемагглютинирующая активность изолятов вируса гриппа птиц на РКЭ

| Наименование<br>изолята | Биологическая и гемагглютинирующая активность изолятов вируса гриппа птиц |                                       |            |                                       |            |                                       |            |
|-------------------------|---|---------------------------------------|------------|---------------------------------------|------------|---------------------------------------|------------|
|                         | Исходная  | I пассаж                              |            | II пассаж                             |            | III пассаж                            |            |
|                         | титр в РГА  | Ig ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> | титр в РГА | Ig ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> | титр в РГА | Ig ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> | титр в РГА |
| 234/02                  | 1:8   | 2,91±0,14                             | 1:128      | 5,67±0,14                             | 1:128      | 5,50±0,43                             | 1:256      |
| 280/02                  | 1:8   | 3,33±0,28                             | 1:256      | 3,91±0,14                             | 1:256      | 6,33±0,28                             | 1:256      |
| 279/02                  | 1:0   | 1,33±0,28                             | 1:128      | 3,33±0,28                             | 1:128      | 5,08±0,28                             | 1:128      |
| 27/02                   | 1:0   | 0                                     | 1:0        | -                                     | -          | -                                     | -          |
| 230/02                  | 1:8   | 3,00±0,25                             | 1:64       | 3,83±0,28                             | 1:256      | 4,33±0,28                             | 1:256      |
| 244/02                  | 1:8   | 5,91±0,14                             | 1:256      | 9,25±0,43                             | 1:256      | 9,58±0,28                             | 1:1024     |
| 272/02                  | 1:2   | 2,33±0,28                             | 1:128      | 6,16±0,28                             | 1:128      | 7,25±0,43                             | 1:256      |
| A/745                   | 1:64  | 4,50±0,43                             | 1:128      | 5,41±0,38                             | 1:128      | 8,25±0,43                             | 1:256      |

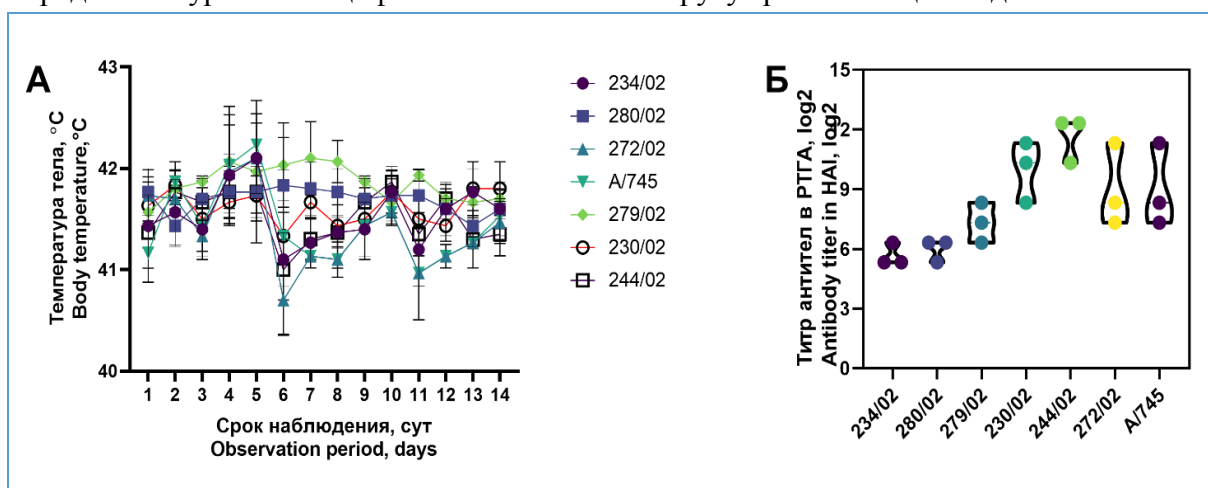
Данные таблицы 1 указывают, что гемагглютинирующая активность исследуемых изолятов вируса гриппа птиц после длительного хранения составила от 1:2 до 1:64, тогда как у 2 изолята гемагглютинирующая активность показала 1:0. После проведенных последовательных пассажей на РКЭ биологической и гемагглютинирующей активности исследуемых изолятов на третьем пассаже значительно увеличивались по сравнению с исходными данными ( $p \leq 0,001$ ) и составляли 4,33-9,58 Ig ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> и 1:128-



1:102, соответственно. При этом изолят «27/02» потерял свою жизнеспособность во время длительного хранения и не восстанавливался при освежении на РКЭ даже в трех генерациях.

*Патогенность изолятов для кур.* Материалы 3 пассажного уровня исследуемых изолятов вируса гриппа птиц использованы для проверки патогенных свойств на птицах. При этом для каждого изолята вируса использованы по 3 курицы, которые были заражены исследуемыми изолятами вируса гриппа, интраназально по 0,2 мл. После инфицирования ежедневно контролировали инфицированных птиц с наблюдением клинических признаков, характерных для гриппа птиц и измерением температуры тела.

Рис. 1. Патогенность исследуемых изолятов ВГП для кур. А – температурная реакция птиц на интраназальное введение изолятов вируса гриппа птиц; Б – результаты определения уровня специфических антител к вирусу гриппа птиц методом РТГА



На рисунке 1А видно, что у всех птиц, инфицированных изолятами вируса гриппа не отмечено какие-либо клинические признаки болезни и повышение температуры тела в течение срока наблюдения. Однако, в группе зараженными изолятами №230/02, 244/02, 279/02 и А/745 у некоторых птиц отмечались повышение температуры тела выше 42 °С. При этом в группе из инфицированных изолятом птиц №244/02 отмечалась гибель зараженных цыплят с 5 по 11 сут после заражения. У остальных птиц, зараженных с другими изолятами не выявлено каких-либо клинических признаков болезни. На 14 сутки определен уровень антигемагглютининов в сыворотках крови инфицированных птиц в РТГА, в которых титр составляет в пределах от 1:40 до 1:2560 (рис. 1Б).

*Идентификация изолятов вируса гриппа с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА). В результате исследований установлено, что все изоляты ВГП относятся к подтипу Н13, кроме изолята ВГП 244/02, 27.02.2021 г., данный изолят положительно реагировал со специфической сывороткой к вирусу болезни Ньюкасла 1:256 и к подтипу Н1 ВГП с активностью 1:16 (таблица 2).*

Таблица 2. Идентификация исследуемых изолятов ВГП в РТГА

| Сыворотки | Исследуемые изоляты в рабочем разведении |        |        |        |       |        |        |
|-----------|--|--------|--------|--------|-------|--------|--------|
|           | 280/02                                   | 234/02 | 244/02 | 279/02 | A/745 | 272/02 | 230/02 |
| SS Н1     | -  | -      | 1:16   | -      | -     | -      | -      |
| SS Н2     | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н3     | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н4     | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н5     | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н6     | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н7     | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н8     | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н9     | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н10    | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н11    | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н12    | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н13    | 1:256                                    | 1:256  | -      | 1:128  | 1:256 | 1:256  | 1:256  |
| SS Н14    | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS Н15    | -  | -      | -      | -      | -     | -      | -      |
| SS БН     | -  | -      | 1:256  | -      | -     | -      | -      |

Примечания: SS Н1-Н15 – специфические сыворотки к гемагглютинину ВГП  
SS БН – специфическая сыворотка к вирусу болезни Ньюкасла.

*Определение субтипов изолятов ВГП методом ОТ ПЦР. Постановку ОТ ПЦР проводили с помощью набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) и ранее разработанных праймеров для субтипирования вируса гриппа А Н13 по гену НА, и N6 по гену NA. Параметры праймеров представлены в таблице 3.*

Таблица 3. Параметры праймеров

| Наименование праймера | Последовательность 5' - 3'  | Т<br>m | С% | Размер<br>продукта, bp |
|-----------------------|-----------------------------|--------|----|------------------------|
| Н13_F                 | ATT GAR GAR TAT GGA AAA GG  | 50-55  | 0  | 335                    |
| Н13_R                 | GTY GAY TCT TTR TCT GCA GC  | 54-60  | 5  |                        |
| N6_57_F               | AGG AAT GAC ACT ATC SGT AGT | 57     |    | 250                    |

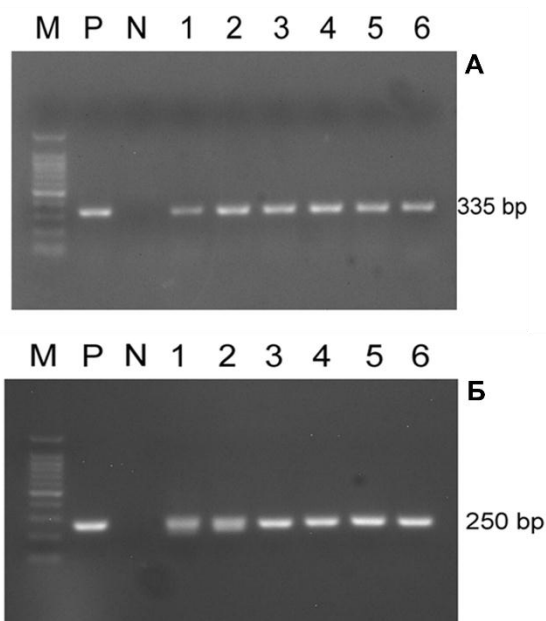


|          |                            |       |   |  |
|----------|----------------------------|-------|---|--|
|          |                            |       | 3 |  |
| N6_307_R | GAY AGR ATR TGC CAT GAG TT | 52-58 | 0 |  |

Состав ПЦР смеси соответствовал следующим значениям: 5 мкл 5х буфера, 1 мкл 10 мМ dNTP mix, по 1 мкл 800 нМ каждого праймера, 1 мкл Enzime, 2 мкл вирусного РНК, до 25 мкл доводили очищенной водой. Программа температурно-временного режима ОТ ПЦР: синтез кДНК при 50 °С – 30 мин., 95 °С – 15 мин., амплификация при 94 °С – 20 сек., 55 °С – 30 сек., 72 °С – 45 сек. 37 циклов, финальная элонгация при 72 °С – 10 мин.

В результате ОТ ПЦР было определено, что все исследованные пробы положительно сработали на субтип Н13 и N6 (см. Рис. 1 и Рис.2)

Рис. 2. Идентификация изолятов ВГП методом ОТ ПЦР. А – Результаты ОТ ПЦР при диагностике вируса гриппа А, субтипа Н13. Б – субтипа N6. М – ДНК маркер на 100 bp; Р – положительный контроль; N – отрицательный контроль; 1-6 – анализируемые пробы.



**Обсуждение.** Казахстан – одно из крупнейших государств по территории Евразийского континента, где проходит трансконтинентальный миграционный путь водоплавающих птиц, являющихся потенциальными источниками эпидемических вариантов вируса гриппа [14]. Это представляет угрозу для птицеводческих предприятий и требует создать стратегическую программу эпиднадзора за вирусом птичьего гриппа для обеспечения быстрого реагирования на вспышку, контроль циркулирующих штаммов вируса и совершенствование диагностических и профилактических ресурсов

для предотвращения заражения и возможного распространения вируса в птицеводческих комплексах.

Сбор, хранение, освежение и идентификация изолятов вируса птичьего гриппа, выделенных на территории Казахстана в коллекции микроорганизмов, должны стать одним из основных направлений этой стратегической программы. Это, в свою очередь, позволяет создать генетический резерв, необходимый для развития отечественных научных исследований и производства. В связи с этим в данной работе нами были освежены 7 изолятов, в которых 6 изолятов относятся к ВГП, выделенных на территории Казахстана во время мониторинговых исследований в 2002-2003 годах. Указанные изоляты хранены в коллекции микроорганизмов в течение 20 лет в нативном виде без добавления каких-либо консервантов или защитных сред. После 20-летнего хранения в коллекции, исследуемые изоляты снижали свою активность до последнего порога активности (1:2), даже некоторые изоляты теряли жизнеспособность и не восстанавливались при пассировании на чувствительной системе (изолят 27/02). У остальных изолятов инфекционную и гемагглютинирующую активность на третьем пассаже в РКЭ составили титры от  $4,33 \pm 0,28$  до  $9,58 \pm 0,28 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$  и от 1:128 до 1:1024, соответственно.

Одной из основных целей этой работы было выявление подтипа вируса, поскольку это играет важную роль в противоэпизоотических мероприятиях для своевременного реагирования и введения мероприятий при вспышке по птичьему гриппу. Основными методами субтипирования в настоящее время являются серологические (реакция торможения гемагглютинации – РТГА) [13], а также методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [15]. В этой работе исследуемые изоляты вирусов были идентифицированы с использованием вышеуказанных тестов. В результате проведенной работы по типированию были установлены, что 6 изолятов из 7 исследуемых проб относятся к субтипу H13 в РТГА, которые в последующим подтверждены методом ОТ ПЦР. При этом в РТГА одна проба показали перекрестные результаты к субтипу H1 и вирусу болезни Ньюкасла, что подтверждает контаминацию этой пробы. Далее при тестировании этих проб на белок нейраминидазы методом ПЦР было установлено, что они принадлежат к подтипу N6.

По литературным данным вирус подтипа H13 был впервые выделен в 1977 г. от чаек (H13N6) в США [16] и впоследствии был обнаружен

преимущественно у чаек и куликов как вирус с низкой патогенностью [17]. В те же годы вирусы с аналогичным подтипом НА выделены от чайковых птиц в бассейне Каспийского моря [18]. В регионе Северного Каспия в 1976-1999 гг. при вирусологическом исследовании более 3000 особей птиц 37 видов, принадлежащих к семействам *Laridae*, *Charadriidae*, *Anatidae*, *Ardeidae*, *Phalacrocoracidae*, выделено 288 штаммов вируса гриппа, представленных подтипами Н3, Н4, Н5, Н6, Н9 и Н13. Среди изолятов доминировали штаммы с антигенной формулой Н13Н6, НА которые характеризовались высокой степенью антигенной вариабельности. В июле 2002 г. и августе 2004 г. в казахстанском секторе Северного Каспия от трех видов чайковых птиц (*Larus argentatus*, *Larus ichthyaetus*, *Hydroprogne caspia*) выделено 19 изолятов вируса гриппа А(Н13Н6). Изучение антигенной структуры казахстанских штаммов выявило их близкое родство с вирусом-эталонном А/чайка/Мэриленд/707/77 (Н13Н6) и между собой. Изоляты проявляли двустороннюю связь, взаимодействовали с иммунными сыворотками от 1:4-1:8 до гомологичных титров и по основным биологическим свойствам существенно не отличались от прототипного вируса [19].

Изоляция вирусов гриппа А субтип Н13Н6 от диких и домашних птиц в Казахстане (Атырауская область, Северный Каспий) были отмечены в 2002 г. – 8 изолятов (чеграва, серебристая чайка, черноглавый хохотун), 2004 г – 11 изолятов (черноглавый хохотун), 2008 г. – 26 изолятов (большая поганька, черноглавый хохотун, лебедь шипун, кваква, серая ворона, белокрылая крачка, красноносный норок) [20]. Несмотря на большой спектр организмов-хозяев большинство вирусов гриппа А, в том числе субтип Н13Н6 относится к группе с низкой патогенности за исключением подтипов Н5 и Н7. Известно, что все штаммы вируса гриппа, поражающие домашних животных или человека, в конечном счете происходят от штаммов с низкой патогенностью, циркулирующих среди диких птиц, особенно водоплавающих [21]. Это требует постоянного изучения патогенности вновь выделяемых изолятов. Причина их высокой или низкой патогенности напрямую связана с сайтом расщепления аминокислотной последовательности НА и протеазой клетки-хозяина. При изучении патогенности исследуемых изолятов на цыплятах установлено, что все испытуемые изоляты (кроме изолята №244/02) не вызывали серьезных клинических признаков заболевания или гибели инфицированных птиц и эти результаты согласуется с данными, полученных другими авторами [22]. При

этом изолят №244/02 вызывал клинические признаки заболевания и гибель инфицированных цыплят, который в последующим идентификации методом РТГА и ПЦР. В результате выявлено, что данная проба была контаминированной вирусом БН и вирусом ВГП, субтип Н1.

**Заключение.** Таким образом, в результате проведенных исследований освежены 6 изолятов вируса гриппа птиц путем трехкратного последовательного пассирования на РКЭ и идентифицированы с помощью молекулярно-генетических методов и РТГА с использованием специфических сывороток к ВГП, а также определены их патогенные свойства по отношению птицам. В результате исследований установлено, что все изоляты вируса относятся к подтипу Н13N6 с низкой патогенностью за исключением изолята 244/02. Изолят 244/02 положительно реагировал со специфической сывороткой к вирусу болезни Ньюкасла 1:256 и к подтипу Н1 ВГПс активностью 1:16. В результате проведенного опыта по изучению патогенности, оказался, что данный изолят вызывал гибель инфицированных цыплят при интраназальной инокуляции.

Все исследуемые изоляты паспортизированы, лиофилизированы с добавлением защитной среды и заложены на хранение с биологической и гемагглютинирующей активностью, которые составили в титрах 4,20-9,70 lg ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> и 1:128-1:1024, соответственно.

#### Литература

1. Afanador-Villamizar A. et al. Avian influenza in Latin America: A systematic review of serological and molecular studies from 2000-2015. / Afanador-Villamizar A. Gomez-Romero C, Diaz A, Ruiz-Saenz J // PLoS ONE. 2017. Vol.12. №6. P.1-21.
2. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. *Influenza Other Respir Viruses* 2012; 6: 1–5.
3. Webster R.G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. / Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. // *Microbiological reviews*. 1992; Vol.56. №1. P.152–179.
4. Chan J.F. et al. Cross-species transmission and emergence of novel viruses from birds. / Chan J.F., To K.K., Chen H, Yuen K.Y. // *Current Opinion in Virology*. 2015. Vol.10. №3. P.63–69.
5. Tong, S. et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. / 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., Donis, R.O. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. Vol.109. №11. P.4269–42774.

6. Amirgazin, A. et al. Highly pathogenic avian influenza virus of the A/H5N8 subtype, clade 2.3.4.4b, caused outbreaks in Kazakhstan in 2020. / Amirgazin, A., Shevtsov, A., Karibayev, T., Berdikulov, M., Kozhakhmetova, T., Syzdykova, L., Ramankulov, Y., & Shustov, A. V. // PeerJ. 2022. Vol.10. P.1-22.
7. WHO. Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance / WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5. // Switherland: Geneva, 2002. – Rev. 1. - 105 p.
8. OIE. (2007). Chapter 2.7.12 Avian Influenza. In: Terrestrial Animal Health Code, Sixteenth Edition. OIE, Paris. - P. 279–285.
9. Жуматов К.Х. Вирусы гриппа А: классификация, структура и распространение в биосфере. Вестник КазНМУ. 2014. -№2. - С.35-36.
10. Hinshaw V.S. et al. Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls. / Hinshaw V.S., Air G.M., Gibbs A.J., Graves L, Prescott B, Karunakaran D. // J Virol. 1982. Vol.42. №3. P.865-872.
11. Ямникова С.С. Мониторинг за циркуляцией ВГА в популяциях диких птиц Северного Каспия / Ямникова С.С., Гамбарян А.С., Федякина И.Т. и др. // Вопр. вирусол. 2001. - №4. - С.39-43.
12. Ишмухаметова Н.Г. Изучение биологических свойств и антигенных взаимосвязей казахстанских штаммов вируса гриппа А с гемагглютинином Н13 / Ишмухаметова Н.Г., Асанова С.Е., Кыдырманов А.И. и др. // Изв. МОН РК. Сер. биол. и мед. 2004. - №4. - С.60-68.
13. Саятов М.Х. Антигенный спектр вирусов гриппа, циркулирующих среди диких и домашних птиц в Республике Казахстан. / Саятов М.Х., Кыдырманов А.И., Жуматов К.Х., Ишмухаметова Н.Г., Даулбаева К.Д., Карамендин К.О., Асанова С.Е., Шахворостова Л.И. // Доклады Национальной Академии наук Республики Казахстан, 2009. -№4. -С.46-50.
14. Roy Chowdhury I et al. Pathogenicity and Transmissibility of North American H7 Low Pathogenic Avian Influenza Viruses in Chickens and Turkeys. / Roy Chowdhury I, Yeddula S.G.R, Kim S.H. // Viruses. 2019. Vol.11. №2. P.163.
15. Daoust, P.Y. et al. Replication of 2 subtypes of low-pathogenicity avian influenza virus of duck and gull origins in experimentally infected Mallard ducks. / Daoust, P.Y., van de Bildt, M., van Riel, D., van Amerongen, G., Bestebroer, T., Vanderstichel, R., Fouchier, R. A., & Kuiken, T. // Vet Pathol. 2013. Vol.50. №3. P.548-559.