

ISSN 1563-0218; eISSN 2617-7498
Индекс 75866; 25866

ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

ХАБАРШЫ

Биология сериясы

КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

ВЕСТНИК

Серия биологическая

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

EXPERIMENTAL BIOLOGY

№1 (82)

Алматы
«Қазақ университеті»
2020



ISSN 1563-0218; eISSN 2617-7498

Индекс 75866; 25866

ХАБАРШЫ

БИОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ №1 (82) наурыз



04. 05. 2017 ж. Қазақстан Республикасының Ақпарат және коммуникация министрлігінде тіркелген

Қуәлік № 16494-Ж

*Журнал жылына 4 рет жарыққа шығады
(наурыз, маусым, қыркүйек, желтоқсан)*

ЖАУАПТЫ ХАТШЫ

Сапарғалиева Н.С., б.ғ.к., аға оқытушы (Қазақстан)
e-mail: bb.kaznu.kz@gmail.com

РЕДАКЦИЯ АЛҚАСЫ:

Бисенбаев А.Қ., б.ғ.д., ҚР ҰҒА академигі (ғылыми редактор)
(Қазақстан)
Бекманов Б.О., б.ғ.к., доцент (ғылыми редактордың орынбасары)
(Қазақстан)
Төлеуханов С.Т., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Айташева З.Г., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Кистаубаева А.С., б.ғ.к. (Қазақстан)
Ивашенко А.Т., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Мухитдинов Н.М., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Нуртазин С.Т., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Турусбеков Е.К., б.ғ.к., қауымдастырылған профессор
(Қазақстан)

Омаров Р.Т., PhD (Қазақстан)
Искаков Б.К., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Сарбасов Д., PhD, профессор (АҚШ)
Орынбаева З., PhD, профессор (АҚШ)
Курмашева Р.Т., PhD (АҚШ)
Сапарбаев М., PhD, профессор (Франция)
Ищенко А., PhD (Франция)
Лось Д., б.ғ.д., профессор (Ресей)

ТЕХНИКАЛЫҚ ХАТШЫ

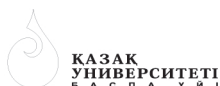
Қайрат Б.Қ., биология магистрі (Қазақстан)

Журнал материалдарында ауқымды биологиялық мәселелері қарастырылады – ғылыми шолу, теориялық және эксперименталдық зерттеулердің нәтижелері.

Мақалалар биологияның келесі бөлімдері бойынша жарияланады: ботаника, биотехнология, биохимия, өсімдіктер физиологиясы, генетика және молекулалық биология, клеткалық биология, биофизика, адам және жануарлар физиологиясы, зоология және ихтиология, цитология және гистология, микробиология және вирусология.



Министерство образования и науки
Республики Казахстан
Официальный интернет-ресурс
Комитета по контролю в сфере
образования и науки



Ғылыми басылымдар бөлімінің басшысы

Гүлмира Шапкозова

Телефон: +7 747 125 6790

E-mail: Gulmira.Shakozova@kaznu.kz

Редакторлары:

Гүлмира Бекбердиева

Агила Хасанқызы

Компьютерде беттеген

Айгүл Алдашева

ИБ № 3322

Пішімі 60x84 ¹/₈. Көлемі 13,8 б.т. Тапсырыс № 13529.

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің
«Қазақ университеті» баспа үйі.

050040, Алматы қаласы, әл-Фараби даңғылы, 71.

«Қазақ университеті» баспа үйінің баспаханасында басылды.

© Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ, 2020

**К.Т. Султанкулова¹, К.К. Акылбаева¹, К.К. Джекебеков¹,
А.Т. Жунушов², А.М. Мелисбек¹, И.А. Зубань³,
М.Б. Орынбаев¹, К.Д. Закарья¹**

¹Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,

Казахстан, пгт. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область, e-mail: sultankul70@mail.ru

²Институт биотехнологии Национальной Академии Наук Кыргызской Республики, Кыргызстан, г. Бишкек

³Северо-Казахстанский Государственный университет им. М. Козыбаева, Казахстан, г. Петропавловск

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НОВЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ СУБТИПА H3N8, ВЫДЕЛЕННЫХ В СЕВЕРНЫХ РЕГИОНАХ КАЗАХСТАНА

Молекулярно-генетический анализ генов вирусных изолятов позволит оценить распространение вируса гриппа А на территории Республики Казахстан. Контроль за гриппом птиц затруднен из-за высокой изменчивости генома вируса. Распространение вирусов гриппа среди диких водоплавающих птиц и мест их обитания представляет собой потенциальную угрозу для здоровья населения. В настоящее время возбудитель гриппа является объектом детального изучения, особенно в плане генетической паспортизации штаммов, используемых для разработки диагностических и профилактических средств.

Целью исследования является изучение молекулярно-генетических свойств новых изолятов вируса гриппа птиц субтипа H3N8, выделенных во время мониторинга гриппа птиц в северных регионах Казахстана. При выполнении исследований были использованы современные методы молекулярной биологии и геномной инженерии. В 2018 году во время вирусологического мониторинга диких птиц в северных регионах Казахстана были выявлены особи, инфицированные вирусом гриппа А. Клоачные смывы двух птиц, в частности широконоски (*Anas platyrhynchos*) и чирок-трескунка (*Anas querquedula*), показали положительную реакцию на вирус гриппа типа А субтипа H3N8 методом ПЦР. В результате исследований получены изоляты вируса гриппа А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8) и А/чирок-трескунка/СКО/45/2018 (H3N8).

Показаны результаты определения нуклеотидных последовательностей и филогенетического анализа важных генов новых изолятов А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8) и А/чирок-трескунка/СКО/45/2018 (H3N8) вируса гриппа птиц. Новые казахстанские изоляты вируса гриппа птиц по составу М-гена наиболее родственные штаммам вируса гриппа птиц субтипа H3N8, выделенными в Монголии в 2018 г.

Результаты молекулярно-генетического анализа новых изолятов вируса гриппа птиц субтипа H3N8, выделенных в северных регионах Казахстана, будут использованы в производстве нового поколения вакцин, диагностикумов и разработке мероприятий по улучшению эпизоотической обстановки по гриппу в Республике Казахстан.

Ключевые слова: генетический анализ, вирус гриппа птиц, дикие птицы, ПЦР, РНК.

**K.T. Sultankulova¹, K.K. Akylbayeva¹, K.K. Jekebekov¹, T.A. Junushov²,
A.M. Melisbek¹, I.A. Zuban³, M.B. Orynbayev¹, K.D. Zakarya¹**

¹Research Institute of Biological Safety Problems,

Kazakhstan, Zhambyl oblast, Gvardeiskiy vil., e-mail: sultankul70@mail.ru

²Institute of biotechnology Of the national Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic, Kyrgyzstan, Bishkek

³North Kazakhstan State University named after M. Kozybaeva, Kazakhstan, Petropavlovsk

Molecular genetic analysis of new isolates of H3N8 subtype avian influenza virus isolated in Northern regions of Kazakhstan

Molecular and genetic analysis of viral isolates genes will allow to estimate the spread of influenza A virus in the territory of the Republic of Kazakhstan. Avian influenza control is difficult due to the high variability of the virus genome. The influenza virus circulation among wild waterfowl and the proximity of humans to their habitats is a potential source of threat to public health. Currently, the influenza agent is the subject of detailed study, especially in terms of genetic certification of strains used for the development of diagnostic and prophylactic agents.

The aim is studying the molecular genetic properties of new isolates of avian influenza virus subtype H3N8 isolated during the monitoring of avian influenza in the Northern regions of Kazakhstan. Modern methods of molecular biology and genetic engineering were used in the research. In 2018, virological monitoring of wild birds in the Northern regions of Kazakhstan revealed individuals infected with influenza A virus. Pharyngeal swabs of two birds in particular shovellers (*Anas clypeata*) and teal cracker (*Anas querquedula*) showed positive reactions for influenza virus type A, subtype H3N8 by PCR. The study obtained isolates of influenza virus A/shoveler/SKO/20/2018 (H3N8) and A/Teal cracker/RMS/45/2018 (H3N8).

Results of determining nucleotide sequences and phylogenetic analysis of the new isolates important genes, A/shoveler/SKO/20/2018 (H3N8) and A/Teal cracker/RMS/45/2018 (H3N8) influenza virus in birds are shown. New Kazakhstan isolates of avian influenza virus on the composition of M-gene show the greatest affinity with the strains of avian influenza virus subtype H3N8 isolated in Mongolia in 2018.

The molecular genetic analysis results of new isolates of the H3N8 subtype avian influenza virus isolated in the Northern regions of Kazakhstan will be used in the new generation of vaccines production, diagnostics and development of measures to improve the influenza epizootic situation in Kazakhstan.

Key words: genetic analysis, avian influenza virus, wild birds, PCR, RNA

К.Т. Султанкулова¹, К.К. Акылбаева¹, К.К. Джекебеков¹, А.Т. Жунушов²,
А.М. Мелисбек¹, И.А. Зубань³, М.Б. Орынбаев¹, К.Д. Закарья¹

¹Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты,
Қазақстан, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, қ.т.п. Гвардейский, e-mail: sultankul70@mail.ru

²Қырғыз Республикасы Ұлттық ғылым академиясының биотехнология институты, Қырғызстан, Бішкек қ.

³М. Қозыбаев атындағы Солтүстік-Қазақстан мемлекеттік университеті, Қазақстан, Петропавловск қ.

Қазақстанның солтүстік өңірлерінде бөлінген құс тұмауы вирусының H3N8 субтипіннің жаңа изоляттарын молекулалық-генетикалық талдау

Вирусты изоляттарының гендерінің молекулалық-генетикалық талдауы Қазақстан Республикасының аумағында А тұмауы вирусының таралуын бағалауға мүмкіндік береді. Вирус геномының жоғары өзгергіштігіне байланысты құс тұмауын бақылау қиын. Жабайы суда жүзетін құстардың арасында тұмау вирусының айналымы және адамның олардың мекендейтін жерлеріне жақындығы халықтың денсаулығына қауіп төндірудің әлеуетті көзі болып табылады. Қазіргі уақытта тұмау қоздырғышы, әсіресе диагностикалық және алдын алу құралдарын әзірлеу үшін пайдаланылатын штамдарды генетикалық паспорттау тұрғысынан егжей-тегжейлі зерттеу объектісі болып табылады.

Зерттеудің мақсаты Қазақстанның солтүстік аймақтарында құс тұмауының мониторингі кезінде бөлініп алынған құс тұмауы вирусының H3N8 субтипіннің жаңа изоляттарының молекулалық-генетикалық қасиеттерін зерттеу болып табылады. Зерттеу барысында молекулалық биология мен гендік инженерияның заманауи әдістері қолданылды. 2018 жылы Қазақстанның солтүстік аймақтарында жабайы құстардың вирусологиялық мониторингі кезінде А тұмауы вирусын жұқтырған құстар анықталды. Екі құстың жұтыну шайындылары, атап айтқанда жалпақ тұмсық үйрек (*Anas clypeata*) пен шүрегей (*Anas querquedula*) ПТР әдісімен А типті тұмау вирусының H3N8 субтипін оң нәтиже көрсетті. Зерттеу нәтижесінде А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8) және А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (H3N8) тұмау вирусының изоляттары алынды.

Құс тұмауы вирусының А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8) және А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (H3N8) жаңа изоляттарының маңызды гендерінің нуклеотидтік тізбектерді анықтау және филогенетикалық талдау нәтижелері көрсетілген. М-генінің құрамы бойынша 2018 жылы Моңғолияда бөлінген құс тұмауы вирусының H3N8 субтипін штамдарымен құс тұмауы вирусының жаңа қазақстандық изоляттары ең жақын туыстық танытады.

Қазақстанның солтүстік өңірлерінде бөлінген H3N8 субтипін құстардың тұмауы вирусының жаңа оқшаулағыштарын молекулалық-генетикалық талдау нәтижелері Қазақстан Республикасында тұмау бойынша эпизоотиялық жағдайды жақсарту жөніндегі іс-шараларды әзірлеуде, диагностикалық жаңа буынын өндірісінде пайдаланылатын болады.

Түйін сөздер: генетикалық талдау, құс тұмауы вирусы, жабайы құстар, ПТР, РНК.

Введение

Эпизоотии гриппа среди сельскохозяйственных птиц, которые наносят значительный экономический ущерб птицеводству, были неодно-

кратно зарегистрированы в различных странах мира [1, 2, 3, 4].

Вирус гриппа А принадлежит семейству *Orthomyxoviridae*. Согласно антигенной специфичности поверхностных гликопротеинов – ге-

магглютинина (НА) и нейраминидазы (НА), проводится субтипирование вируса гриппа А [5]. Вирусы гриппа являются одними из самых распространенных патогенов человека и ежегодно приводят к эпидемиям по всему миру [6]. В настоящее время известно 18 подтипов гемагглютинина (НА) и 11 подтипов нейраминидазы (НА) вирусов гриппа А. Вирусы, содержащие субтипы гемагглютинина с 1 по 16 и нейраминидазы с 1 по 9, изначально возникали в популяциях водоплавающих птиц, и затем переходили в популяции млекопитающих, в том числе человека [7, 8]. В 2012 и 2013 гг. в Центральной и Южной Америке выделены от летучих мышей два новых субтипа вируса гриппа А (H17N10 и H18N11) [9]. В результате мутации в одном из полимеразных генов вирус гриппа способен периодически преодолевать межвидовой барьер, повышающей уровень изменчивости возбудителя. В итоге возникает значительно большее количество его вариантов, что создает лучшие условия для адаптации в организме различных видов животных и птиц [10]. Большинство видов птиц, включая сельскохозяйственных, синантропных, экзотических и декоративных птиц, а также млекопитающие (свиньи, лошади, хорьки, мыши, кошки, собаки и другие) и человек восприимчивы к вирусу гриппа А [11, 12]. Основным резервуаром вируса гриппа А – птицы водно-околоводного экологического комплекса, преимущественно представители семейств утиных и чайковых. Следует, что основным источником вируса в природе являются водоплавающие птицы, которые переносят вирус в кишечнике и выделяют его в окружающую среду со слюной и пометом. У диких уток ВГА размножается главным образом в клетках, выстилающих желудочно-кишечный тракт, при этом никаких видимых признаков заболевания у самих птиц вирус не вызывает и в высоких концентрациях выделяется в окружающую среду. Бессимптомное течение гриппа у диких уток и болотных птиц к данному хозяину на протяжении сотен лет может являться результатом адаптации вируса. Таким образом, создается природный резервуар, обеспечивающий вирусам гриппа птиц биологическое «бессмертие» [13]. Вирус гриппа А может вызывать тяжелое заболевание и гибель среди домашних птиц. Данное заболевание характеризуется и потенциально высокой опасностью возбудителя для человека. Дикие птицы, которые относятся к отрядам *Anseriformes* (утки, гуси, лебеди)

и *Charadriiformes* (прибрежные виды вместе с чайками), образуют естественный резервуар вирусов гриппа А в природе, которые могут происходить трансмиссией к другим хозяевам [14].

В период с 1998 г. по 2006 г. проведенные мониторинговые исследования на территории Европы [15], показали, что самые распространенные подтипы ВГП в популяциях диких птиц это подтипы H3 и H4.

В 2005 г. эпизоотии высокопатогенного вируса гриппа А/H5N1 на территории юга Западной Сибири, включая Новосибирскую область, а также на Урале, в Монголии и Китае явились предпосылками к изучению и мониторингу различных вариантов вируса в популяции диких птиц, а также к исследованиям их генетических, патогенных и антигенных свойств [16].

Одним из мест скопления птиц являются небольшие озера, расположенные в Северо-Казахстанской области. Камышловское озеро расположено в древней долине реки Камышловки в Омской области России и Северо-Казахстанской области РК. Камышловский лог – это древняя долина высохшей реки Камышловки расположенная в Омской области Российской Федерации и Северо-Казахстанской области Республики Казахстан, является охраняемой орнитологической территорией, на которой гнездятся птицы, занесённые в Красную книгу России: лебедь-шипун, кроншнеп, шилоклювка, ходулочник, большая белая цапля, савка и др.

Озеро Алуа (Алва) – находится к северо-западу от села Явленка в Есильском районе Северо-Казахстанской области. В Северо-Казахстанской области расположено, мелководное озеро Займище, с сплошь заросшими тростниками. Сильно зарастающие у берегов тростником, эти озёра имеют хорошо развитые подводные луга из погруженной растительности и отличаются высокой кормностью. В соседней Сибири в период гнездовых и миграционных миграций встречаются популяции диких птиц Африки, Европы, Центральной и Южной Азии, что способствует внедрению различных вариантов вируса гриппа А из довольно отдаленных географических районов [17, 18].

Целью исследования является изучение молекулярно-генетических свойств новых изолятов вируса гриппа птиц субтипа H3N8, выделенных во время мониторинга гриппа птиц в северных регионах Казахстана.

Материалы и методы

Объекты исследования

С 2018 г. проводился сбор материалов (кloакальные смывы) от разных видов диких птиц. Территорией для сбора материала послужили мелкие озера (Алуа и Займище) Северо-Казахстанской области.

Поступивший в лабораторию биоматериал для вирусологических исследований подвергался предварительной обработке согласно стандартным операционным процедурам, разработанным в НИИПББ КН МОН РК: «СОП по отлову диких птиц», «Получение образцов биологического материала из мазков», «Маркировка образцов биологических материалов без применения штрих-кодов», «План мероприятий по предотвращению контактов с опасными материалами».

Всего исследованы образцы клоакальных смывов от 90 диких птиц семейства Anatidae, Accipitridae, Rallidae, Podicipedidae. Клоачные пробы собирались асептически и хранились и транспортировались в жидком азоте. Образцы хранили при -40°C до исследования.

Выделение вирусной РНК проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hidden) в соответствии с рекомендациями производителя из 140 мкл вирус-содержащей жидкости.

Синтез кДНК

Обратную транскрипцию для синтеза кДНК проводили с ревертазой – 200 ед/мкл M-MLV ферментом, синтезирующий кДНК на матрице РНК, при помощи праймера Uni 12(AG-CAAAAGCAGG).

Реакционная смесь:

РНК вируса – 1 мкл

Uni-12 (hexaprimer) – 1 мкл

или специфический праймер, инкубирование 70°C, 5 мин.

Добавить:

Буфер для синтеза кДНК - 4 мкл

Ингибитор РНКазы - 1 мкл

10 mM дНТФ – 2 мкл, инкубирование при 37°C, 5 мин.

200 ед/мкл M-MLV фермент – 1 мкл

Вода – до 20 мкл, инкубирование при 42°C, 60 мин.

Реакцию останавливали нагреванием при 70°C, 10 мин.

Полученная в реакции обратной транскрипции кДНК используется для постановки ПЦР. кДНК следует хранить при температуре минус 20 °C.

Постановка полимеразной цепной реакции

ПЦР-смесь для амплификации кДНК состоит из следующих компонентов: Taq ДНК полимеразы – 0,25 мкл (5 ед/мкл); 10x ПЦР-буфер – 2,5 мкл; специфические праймеры (20 пМ) прямой и обратный праймер – по 1 мкл каждого; смесь дНТФ (10 mM) – 1 мкл; 25 mM раствор хлорида магния – 2 мкл; ДНК – 3 мкл. Деионизированная вода – 14,25 мкл.

Температурно-временной режим амплификации проводили согласно программе: 1) 50°C – 30 мин.; 94 °C – 2 мин.; 2) 35 циклов 94 °C – 30 сек.; 50 °C – 30 сек.; 68 °C – 1 мин., пост-амплификация 68 °C – 7 мин. Амплификацию проводили на амплификаторе GeneAmp PCR 2720, Applied Biosystems (США).

Таблица 1 – Праймеры используемые для типирования и субтипирования вируса гриппа

Целевой ген	Название праймера	Последовательность праймера	Размер продукта, п.о.
М	InfA_M68F	GTTCCGTCAGGCCCTCAA	185
	InfA_M253R	ACGCTGCAGTCCTCGCTCAC	
НА [19]	H3-919F	GYATYACTCCWAATGGAAGC	376
	H3-1294R	ATTCTYCCTTCYACTTCDGA	
NA [20]	N8-93F	CATRTVGTBAGYATYAYARTAAC	137
	N8-93R	ACAYTRGYATTGTRCCATTG	

Секвенирование

Подготовку проб для секвенирования проводили с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit» фирмы Applied Biosystems. Секвенирование проводили на автоматическом 16-капиллярном секвенаторе «3130xl Genetic Analyzer» (Applied Biosystems/Hitachi). Анализ и сборку нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы Sequencer v 4.0 [21].

Сравнительный и филогенетический анализ

Сравнительный анализ по нуклеотидным последовательностям проводили в программных модулях веб-сайта NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей генов вируса гриппа А осуществляли с помощью программы BLAST в базе данных Gene Bank.

Филогенетический анализ последовательностей проводили с помощью программы Mega 6.06. Филогенетическое древо было построено с

использованием *Neighbor-joining* метода и модели Kimura 2-parameter с включениями замен d: Transitions + Transversions, а также включением кодонов 1st+2nd+3rd+Non-Coding и повторности бутстрапов 500.

Результаты и обсуждение

В 2018 г. при мониторинге гриппа птиц выявлен субтип А/H3N8 у диких птиц, обитающих в озерах Алуа и Займище Северо-Казахстанской области. Характеристики биологических образцов, отобранных от диких птиц Северо-Казахстанской области представлены в таблице 2.

Основную роль в циркуляции вируса гриппа А играют представители семейства утиных (Anatidae) отряда гусеобразных (Anseriformes), а именно виды чирок-свистунок (*Anas crecca*), чирок-трескунок (*Anas querquedula*), и широконоска (*Anas platyrhynchos*). Данные виды птиц являются основным природным резервуаром вируса гриппа А [22].

Таблица 2 – Характеристика биологических образцов, отобранных от диких птиц в Северо-Казахстанской области

№	Рег. №	Вид птицы	Место взятия биологических образцов	Координаты	ОТ-ПЦР- на грипп типа А	ПЦР на субтип НЗ	ПЦР на субтип N8
1	20	Широконоска (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Озеро Алуа, п. Явленка, Есильский район, Северо-Казахстанская область	54°22' 50,6» 68°17' 06,6»	+	+	+
2	45	Чирок-трескунок (<i>Anas querquedula</i>)	Озеро Займище, Пресновка, Жамбылский район, Северо-Казахстанская область	54°42' 40,6» 67°20' 50,6»	+	+	+

При лабораторном мониторинге были использованы молекулярные методы диагностики – ОТ-ПЦР на наличие вируса гриппа типа А и субтипирования.

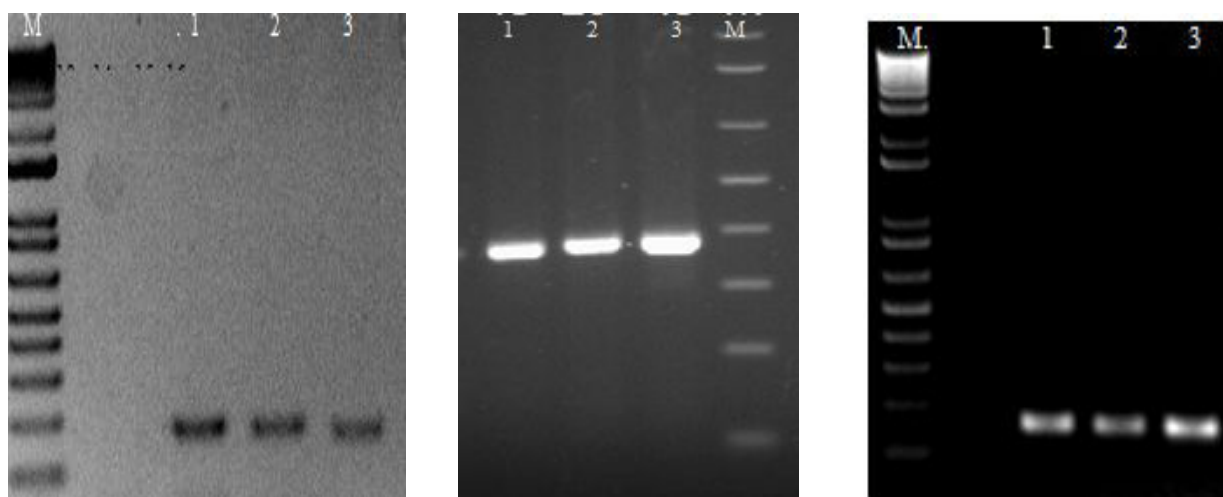
Таким образом, по результатам исследования вирус гриппа типа А идентифицирован как субтип H3N8 в образцах, выделенных от широконоски (*Anas platyrhynchos*) и чирка-трескунка (*Anas querquedula*), обитающих в мелких озерах Северо-Казахстанской области. Результаты выявления вируса гриппа типа А, субтипа H3N8 представлены на рисунке 1.

Исследуемые биологические образцы от широконоски (*Anas platyrhynchos*) и чирка-трескунка (*Anas querquedula*) показали положительную

реакцию на вирус гриппа типа А, субтип H3N8. наблюдается ПЦР продукт размером 185 п.о.; на подтип НЗ наблюдается полоса ПЦР продукта размером 376 п.о.; на подтип N8 наблюдается полоса ПЦР продукта размером 137 п.о.

В результате исследования получены изоляты вируса гриппа А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8) и А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (H3N8).

Субтип НЗ (более 80 % положительных на вирус гриппа А) в настоящее время является самым распространенным и в человеческих популяциях, вызывая ежегодные эпидемии по всему миру [23]. На территории Российской Федерации были выделены и идентифицированы изоляты ВГА H3N8 и H4N6 [24, 25].



Электрофореграмма ПЦР-продуктов М гена вируса гриппа А. М – Маркер ДНК; 1 – Положительный контроль на вирус гриппа типа А (185 п.о.); 2 – ПЦР-продукт фрагмента М гена из образца № 20 широконоски (*Anas cyreata*); 3 – ПЦР-продукт фрагмента М гена из образца № 45 чирка-трескунка (*Anas querquedula*);

Электрофореграмма ПЦР-продуктов гемагглютинина Н3. М – Маркер ДНК; 1 – Положительный контроль на субтип Н3 вируса гриппа типа А (376 п.о.); 2 – ПЦР-продукт гемагглютинина Н3 из образца № 20 широконоски (*Anas cyreata*); 3 – ПЦР-продукт гемагглютинина Н3 из образца № 45 чирка-трескунка (*Anas querquedula*);

Электрофореграмма ПЦР-продуктов нейраминидазы N8. М – Маркер ДНК; 1 – Положительный контроль на субтип N8 вируса гриппа типа А (137 п.о.); 2 – ПЦР-продукт нейраминидазы N8 из образца № 20 широконоски (*Anas cyreata*); 3 – ПЦР-продукт нейраминидазы N8 из образца № 45 чирка-трескунка (*Anas querquedula*);

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов фрагментов генов вируса гриппа типа А, субтипа Н3N8.

Выявление субтипа Н3N8 у диких птиц согласуются с рядом научных работ [23, 26, 27, 28], опубликованных в научной литературе.

Для определения степени генетического родства казахстанских изолятов вируса гриппа А/широконоска/СКО/20/2018 (Н3N8) и А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (Н3N8) с референсными вирусами из международной базы данных проведено секвенирование ПЦР продуктов М и NS генов, по результатам которого определены их нуклеотидные последовательности. Нуклеотидные последовательности М и NS генов приведены на рисунках 2 и 3.

При проведении сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей М гена двух казахстанских изолятов вируса гриппа А/широконоска/СКО/20/2018 (Н3N8) и А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (Н3N8) выделенных в 2018 г. в северных регионах Казахстана, было выяснено, что изоляты отличаются наличием 15 нуклеотидных замен. Результаты сравнительного анализа представлены на рисунке 4. Анализ нуклеотидной последовательности М гена казах-

станских изолятов вируса гриппа А/широконоска/СКО/20/2018 (Н3N8) и А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (Н3N8) программой BLAST показал, что гомологичность последовательностей между ними составляет 98,54%.

BLAST анализ показал 100 % идентичность NS гена казахстанских изолятов вируса гриппа А/широконоска/СКО/20/2018 (Н3N8) и А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (Н3N8). Результаты представлены на рисунке 5.

Дальнейшие исследования были направлены на проведение сравнительного анализа М гена новых изолятов вируса гриппа птиц с имеющимися данными в международном банке генов и составления филогенетического древа. Для определения филогенетических характеристик двух изолятов вируса гриппа А/широконоска/СКО/20/2018 (Н3N8) и А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (Н3N8) секвенированный участок М гена выравнивали с нуклеотидными последовательностями штаммов вируса гриппа из международного банка данных. Результаты представлены на рисунке 6.

AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCAGGTCGAAACGTACGTTCTCTATCGTCCCCTCAGG CCCCCTCAAAGCCGAGATAGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTTTCAGGGAAGAACACAGATCTCGAGGCTCT CATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTAGGGTTTGTGTTACGCTCACCGT GCCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTAAATGGAAATGGAGACCCAAACAA CATGGACAGGGCAGTCAAACCTGTACAGGAACTGAAGAGAGAGATAACATTTTCATGGGGCTAAAGAAGTTGCACTCA GTTACTCAACCGGTGCACTTGCCAGTTGTATGGGTCTCATATACAACAGAATGGGGACAGTGACCACAGAAGT GGCGTTTGGCCTAGTGTGTGCCACCTGTGAGCAGATTGCTGATTACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGTGACTAC CACCAACCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAGAT GGCTGGGTGAGTGAGCAAGCAGCGGAAGCAATGGAGGTTGCCAGTCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCGATGAGG ACCATTTGAACTCACCTAGCTCCAGTGCCGGTCTGAAAGATGATCTTCTTGAATAATTGCAGGCCTACCAGAAACGG ATGGGAGTGCAATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTTATTGCCGCAAGTATCATTGGGATCTTGCAGTTGATATTG TGGATTCTTGATCGTCTTTCTTCAAATGCATTATCGTTCGCTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAG GAGTGCCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTATCGGCAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCA ACATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGTCTACT
Нуклеотидная последовательность М гена изолята А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8)
AGCAAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGGATTCCAACACAGTGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGCTTTCTTTGGCATG TCCGCAAACGATTTGCAGACCAAGAAGTGGGTGATGCCCCATTCTTGACCGGCTTCGCCGAGATCAGAAGT CCCTAAGAGGAAGAGGCAGCACTCTTGGTCTGGATATCGAGACAGTACTCATGCAGGAAAGCAGATAGTGAGCGG ATTCTGGAAGAAGAATCTGATGAGGCACTCAAATGACCATTTGCTTCAGTGCCGGCTTCACGCTACCTAACTG ACATGACTCTTGAAGAGATGTCAAGGGACTGGTTCATGCTTATGCCAAACAGAAAGTGGCAGTTCCCTTTGTCATCA GAATGGACAGGCAATAATGGATAAAAAACATCATTTGAAAGCAATTTTCAGTGTGATTTTGACGCGCTGG AGACTCTAATACTACTTAGAGCTTTCACAGAAGAAGGAGCAATTGTGGGAGAAATCTCACCGTTACCTTCTCTCCAG GACATACTGATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAG TTCGAGTCTCTGAACTCTACAGAGATTGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGGATGGGAGACCTCCACTCCCTCCAAAGC AGAAACGGAAAAATGGCGAGAACAATTGAGTCAGAAGTTTGAAGAAATAAGATGGCTGATTGAAGAAGTGCGA CATAGAGTTACAGGTTACAGAGACGCTTCGAACAAATAACGTTTATGCAAGCCTTACAACATTGCTTGAAGTGAG CAAGAGATAAGAACTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATGATAAAAAACACCTTGTCTACT
Нуклеотидная последовательность NS гена изолята А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8)

Рисунок 2 – Нуклеотидная последовательность М и NS генов изолята А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8)

AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCAGGTCGAAACGTACGTTCTCTATCGTCCCCTCAGG CCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTTTCAGGGAAGAACACCGATCTAGAGGCTCT CATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTAGGGTTTGTGTTACGCTCACCGT GCCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGACCCAAACAA CATGGACAGGGCAGTCAAACCTGTACAGGAAATGAAGAGAGAGATAACATTTCCATGGGGCTAAAGAAGTTGCACTCA GTTACTCAACCGGTGCACTTGCCAGTTGTATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGGACGGTGACCACAGAAGT GGCGTTTGGCCTAGTGTGTGCCACCTGTGAGCAGATTGCTGACTCACAGCATCGGTCTCACAGGCAGATGGTAACTAC CACCAACCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAGAT GGCTGGGTGAGTGAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCGATGAGG ACCATTTGAACTCACCTAGCTCCAGTGCCGGTCTGAAAGATGATCTTCTTGAATAATTGCAGGCCTACCAGAA ACGGATGGGAGTGCAATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTTATTGCCGCAAGTATCATTGGGATCTTGCAGTTGA TATTGTGATTCTTGATCGTCTTTCTTCAAATGCGTTTATCGTCGCTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGCCTTCTACG GAAGGAGTGCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTATCGGCAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTT TGTCACATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGTCTACT
Нуклеотидная последовательность М гена изолята А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (H3N8)
AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCAGGTCGAAACGTACGTTCTCTATCGTCCCCTCAGG CCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTTTCAGGGAAGAACACCGATCTAGAGGCTCT CATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTAGGGTTTGTGTTACGCTCACCGT GCCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGACCCAAACAA CATGGACAGGGCAGTCAAACCTGTACAGGAAATGAAGAGAGAGATAACATTTCCATGGGGCTAAAGAAGTTGCACTCA GTTACTCAACCGGTGCACTTGCCAGTTGTATGGGTCTCATATACAACAGGATGGGGACGGTGACCACAGAAGT GGCGTTTGGCCTAGTGTGTGCCACCTGTGAGCAGATTGCTGACTCACAGCATCGGTCTCACAGGCAGATGGTAACTAC CACCAACCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAGAT GGCTGGGTGAGTGAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCGATGAGG ACCATTTGAACTCACCTAGCTCCAGTGCCGGTCTGAAAGATGATCTTCTTGAATAATTGCAGGCCTACCAGAA ACGGATGGGAGTGCAATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTTATTGCCGCAAGTATCATTGGGATCTTGCAGTTGA TATTGTGATTCTTGATCGTCTTTCTTCAAATGCGTTTATCGTCGCTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGCCTTCTACG GAAGGAGTGCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTATCGGCAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTT TGTCACATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGTCTACT
Нуклеотидная последовательность NS гена изолята А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (H3N8)

Рисунок 3 – Нуклеотидная последовательность М и NS генов изолята А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (H3N8)

Sequence ID: Query_125517 Length: 1027 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1027 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1814 bits(982)	0.0	1012/1027(99%)	0/1027(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCT			60
Sbjct 1	AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCT			60
Query 61	CTCTATCGTCCCGTCAGGCCCTCAAAGCCGAGATAGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTT			120
Sbjct 61	CTCTATCGTCCCGTCAGGCCCTCAAAGCCGAGATAGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTT			120
Query 121	TGCAGGGAAGAACACAGATCTCAGGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCT			180
Sbjct 121	TGCAGGGAAGAACACCGATCTAGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCT			180
Query 181	GTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGGTTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCG			240
Sbjct 181	GTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGGTTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCG			240
Query 241	AGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTAAATGGAAATGGAGACCCAAACAA			300
Sbjct 241	AGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGACCCAAACAA			300
Query 301	CATGGACAGGGCAGTCAAACGTACAGGAAACTGAAGAGAGAGATAACATTTTCATGGGGC			360
Sbjct 301	CATGGACAGGGCAGTCAAACGTACAGGAAATTGAAGAGAGAGATAACATTTTCATGGGGC			360
Query 361	TAAAGAAGTTGCACTCAGTTACTCAACCGGTGCCTTGCCAGTTGTATGGGTCTCATATA			420
Sbjct 361	TAAAGAAGTTGCACTCAGTTACTCAACCGGTGCCTTGCCAGTTGTATGGGTCTCATATA			420
Query 421	CAACAGAATGGGGACAGTGACCACAGAAGTGGCGTTTGGCCTAGTGTGTGCCACCTGTGA			480
Sbjct 421	CAACAGGATGGGGACGGTGACCACAGAAGTGGCGTTTGGCCTAGTGTGTGCCACCTGTGA			480
Query 481	GCAGATTGCTGATTACAGCATCGGTCTCACAGACAGATGGTGAACACCAACCCACT			540
Sbjct 481	GCAGATTGCTGACTCACAGCATCGGTCTCACAGGACAGATGGTAACTACCACCAACCCACT			540
Query 541	AATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAGAT			600
Sbjct 541	AATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAGAT			600
Query 601	GGCTGGGTGAGTGAGCAAGCAGCGGAAGCAATGGAGGTTGCCAGTCAGGCTAGGCAGAT			660
Sbjct 601	GGCTGGGTGAGTGAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAGAT			660
Query 661	GGTGCAGGCGATGAGGACCATTTGGAACCTACCCCTAGCTCCAGTGCCGGTCTGAAAGATGA			720
Sbjct 661	GGTGCAGGCGATGAGGACCATTTGGAACCTACCCCTAGCTCCAGTGCCGGTCTGAAAGATGA			720
Query 721	TCTTCTTGAAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAAATGCAGCGATTCAA			780
Sbjct 721	TCTTCTTGAAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAAATGCAGCGATTCAA			780
Query 781	GTGATCCTCTCGTTATTGCCGCAAGTATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCT			840
Sbjct 781	GTGATCCTCTCGTTATTGCCGCAAGTATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCT			840
Query 841	TTGATCGTCTTTTCTTCAAATGCATTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGC			900
Sbjct 841	TTGATCGTCTTTTCTTCAAATGCATTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGC			900
Query 901	CTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTATCGGCAGGAACAGCAGAGTG			960
Sbjct 901	CTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTATCGGCAGGAACAGCAGAGTG			960
Query 961	CTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGT			1020
Sbjct 961	CTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGT			1020
Query 1021	TTCTACT 1027			
Sbjct 1021	TTCTACT 1027			

Рисунок 4 – Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности М гена казахстанских изолятов вируса гриппа А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8) и А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (H3N8)

Range 1: 1 to 1027 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1897 bits(1027)	0.0	1027/1027(100%)	0/1027(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCT			60
Sbjct 1	AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCT			60
Query 61	CTCTATCGTCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTT			120
Sbjct 61	CTCTATCGTCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTT			120
Query 121	TGCAGGGAAGAACACCGATCTAGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCT			180
Sbjct 121	TGCAGGGAAGAACACCGATCTAGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCT			180
Query 181	GTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGGTTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCG			240
Sbjct 181	GTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGGTTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCG			240
Query 241	AGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGACCCAAACAA			300
Sbjct 241	AGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGACCCAAACAA			300
Query 301	CATGGACAGGGCAGTCAAACGTACAGGAAATTGAAGAGAGAGATAACATTCCATGGGGC			360
Sbjct 301	CATGGACAGGGCAGTCAAACGTACAGGAAATTGAAGAGAGAGATAACATTCCATGGGGC			360
Query 361	TAAAGAAGTTGCACTCAGTTACTCAACCGGTGCACTTGCCAGTTGTATGGGTCTCATATA			420
Sbjct 361	TAAAGAAGTTGCACTCAGTTACTCAACCGGTGCACTTGCCAGTTGTATGGGTCTCATATA			420
Query 421	CAACAGGATGGGGACGGTGACCACAGAAGTGGCGTTTGGCCTAGTGTGTGCCACCTGTGA			480
Sbjct 421	CAACAGGATGGGGACGGTGACCACAGAAGTGGCGTTTGGCCTAGTGTGTGCCACCTGTGA			480
Query 481	GCAGATTGCTGACTCACAGCATCGGTCTCACAGGCAGATGGTAACACCACCAACCCACT			540
Sbjct 481	GCAGATTGCTGACTCACAGCATCGGTCTCACAGGCAGATGGTAACACCACCAACCCACT			540
Query 541	AATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAGAT			600
Sbjct 541	AATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAGAT			600
Query 601	GGCTGGGTGAGTGAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAGAT			660
Sbjct 601	GGCTGGGTGAGTGAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAGAT			660
Query 661	GGTGCAGGCGATGAGGACCATTGGAACCTACCCCTAGCTCCAGTGCCGGTCTGAAAAGATGA			720
Sbjct 661	GGTGCAGGCGATGAGGACCATTGGAACCTACCCCTAGCTCCAGTGCCGGTCTGAAAAGATGA			720
Query 721	TCTTCTTGAAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAAATGCAGCGATTCAA			780
Sbjct 721	TCTTCTTGAAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAAATGCAGCGATTCAA			780
Query 781	GTGATCCTCTCGTTATTGCCGCAAGTATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATT			840
Sbjct 781	GTGATCCTCTCGTTATTGCCGCAAGTATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATT			840
Query 841	TTGATCGTCTTTTCTTCAAATGCGTTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGC			900
Sbjct 841	TTGATCGTCTTTTCTTCAAATGCGTTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGC			900
Query 901	CTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTATCGGCAGGAACAGCAGAGTG			960
Sbjct 901	CTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTATCGGCAGGAACAGCAGAGTG			960
Query 961	CTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGT			1020
Sbjct 961	CTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGT			1020
Query 1021	TTCTACT 1027			
Sbjct 1021	TTCTACT 1027			

Рисунок 5 – Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности NS гена казахстанских изолятов вируса гриппа А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8) и А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (H3N8)

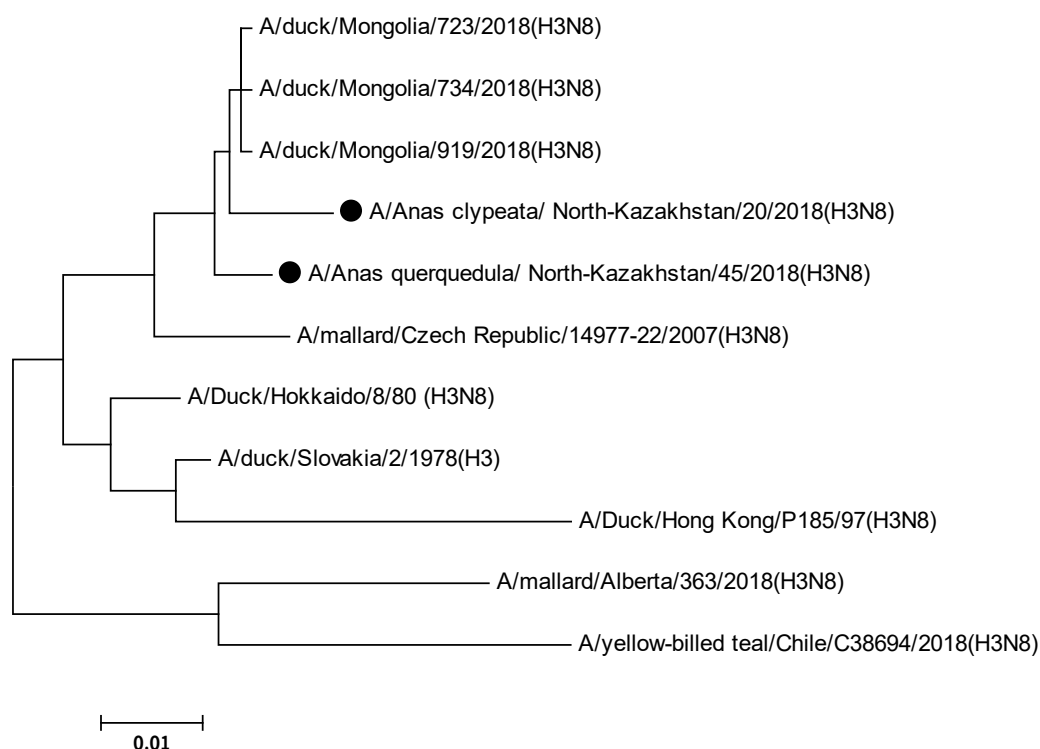


Рисунок 6 – Сравнение нуклеотидных последовательностей участка М гена изолятов А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8) (A/Anas clypeata/ North-Kazakhstan/20/2018(H3N8)) и А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (H3N8) (A/Anas querquedula/North-Kazakhstan/45/2018(H3N8)) со штаммами вируса гриппа из международного банка данных

Изучение филогенетических взаимоотношений вируса гриппа А, циркулирующих в разных географических территориях, необходимо для выявления механизмов их распространения.

Новые два изолята вируса гриппа птиц А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8) и А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (H3N8) по М гену наибольшее родство проявили со штаммами A/duck/Mongolia/723/2018 (H3N8), A/duck/Mongolia/734/2018 (H3N8), A/duck/Mongolia/919/2018 (H3N8), выделенными в Монголии в 2018 г. Сочетание географических особенностей делает Монголию идеальным местом для понимания эпидемиологии вирусов птичьего гриппа у диких птиц. Через Монголию проходят четыре основных миграционных пути (Восточная Азия/Австралия, Центральная Азия/Индия, Западная Азия/Африка и Средиземное море/Черноморское побережье). Около 391 вида перелетных птиц прибывают в Монголию. В последние годы были выделены различные подтипы вируса гриппа: H3N8, H4N6, H7N7, H7N9, H3N1, H3N2, H4N2 и H10N6. Вирусы принадлежали Евро-Азиатским линиям [29].

Анализ данных литературы позволяет сделать вывод о широком распространении вирусов гриппа А/Н3 и глобальной угрозе, которую они несут здоровью человека и животных. Отличительные особенности эволюционной изменчивости и межвидового переноса возбудителей гриппа подтипа Н3 имеют особую значимость для Казахстана.

Территория Республики Казахстан занимает уникальное положение в центре Евразии, где проходят и пересекаются трансконтинентальные миграционные пути диких птиц, являющихся естественным резервуаром вирусов гриппа.

Животный мир отличается видовым разнообразием и включает практически весь спектр хозяев и переносчиков заболевания. Республика Казахстан имеет протяженную границу с Китаем, где чаще всего возникают новые эпидемические варианты вирусов. Все это обуславливает важность проведения мониторинга этих вирусов на территории Казахстана и изучения их фундаментальных молекулярно-генетических свойств [30].

Заключение

Постоянные наблюдения за циркуляцией вируса гриппа в природных популяциях птиц и определение молекулярно-генетических свойств выделенных штаммов необходимы для предупреждения эпизоотий среди сельскохозяйственных и домашних птиц и эпидемий среди людей.

По результатам работ выделены два новых изолята вируса гриппа А – А/широконоска/СКО/20/2018 (H3N8) и А/чирок-трескунок/СКО/45/2018 (H3N8). Изучение распространения вируса гриппа А по Казахстану показало, что

в мелких озерах Алуа и Займище Северо-Казахстанской области, несмотря на большое скопление птиц на осеннем пролете 2018 г., по результатам ПЦР анализа выявлен только РНК вируса гриппа А субтипа – H3N8. Новые казахстанские изоляты вируса гриппа А субтипа – H3N8 по М гену наибольшее родство проявили со штаммами, выделенными у диких птиц на территории соседней Монголии в 2018 г.

Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования «Молекулярно-эпизоотологический мониторинг гриппа птиц в Казахстане», 2018–2020 гг., №AP05132659.

Литература

1. Alexander D. J. A review of avian influenza in different bird species /D. J. Alexander // *Vet Microbiol.* 2000. – № 74(1-2). – С. 3-13.
2. Horimoto T. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses / T. Horimoto, Y. Kawaoka // *Clin Microbiol Rev.* -2001. № 14(1). – 129-149.
3. Jiang H, Wu P, Uyeki TM, He J, Deng Z, Xu W, Lv Q, Zhang J, Wu Y, Tsang TK, Kang M, Zheng J, Wang L, Yang B, Qin Y, Feng L, Fang VJ, Gao GF, Leung GM, Yu H and Cowling BJ, 2017. Preliminary Epidemiologic Assessment of Human Infections With Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N6) Virus, China. *Clinical Infectious Diseases*, 65, 383-388. doi:10.1093/cid/cix334
4. Kwon HI, Kim EH, Kim YI, Park SJ, Si YJ, Lee IW, Nguyen HD, Yu KM, Yu MA, Jung JH, Choi WS, Kwon JJ, Ahn SJ, Baek YH, Van Lai D, Lee OJ, Kim SW, Song MS, Yoon SW, Kim CJ, Webby RJ, Mo IP and Choi YK, 2018. Comparison of the pathogenic potential of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N6, and H5N8 viruses isolated in South Korea during the 2016-2017 winter season. *Emerg Microbes Infect*, 7, 29. doi:10.1038/s41426-018-0029-x
5. Huang Y., Tang H., Duffy S., Hong Y., Norman S., Ghosh M. et al. Multiplex Assay for Simultaneously Typing and Subtyping Influenza Viruses by Use of an Electronic Microarray // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – 47 (2). – P. 390-396.
6. Белов А.П., Огарков П.И. Зоонозный (птичий) грипп: опасности (взгляд эпидемиолога) // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* – 2007. -№ 5 (22). – С. 3-8.
7. Разработка методов ПЦР для выявления вируса гриппа птиц подтипов H3, H4, H5 и изучение биологических свойств изолятов вируса. Тема диссертации и автореферата по ВАК РФ 03.02.02, кандидат биологических наук Бабин Ю.Ю. 2012, Владимир
8. Khanna M, Kumar P, Choudhary K, Kumar B, Vijayan VK (2008). Emerging influenza virus: a global threat. *J. Biosci.*, 33 (4), 475-482.
9. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *CDC PLoS Pathog.*, 9 (10), e1003657.
10. Anthony S.J., et al. Emergence of fatal avian influenza in New England harbor seals // *mBio.* – 2012. – №3(4);
11. Литвинова О.М., Смородинцева Е.А., Деева Э.Г., Лобова Т.Г., Коновалова Н.И. Этиология современного гриппа // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* -2001. – № 1. – С. 5-9.
12. Olsen B., Munster V.J., Wallensten A., Waldenstrom J., Osterhaus A.D., Fouchier R. Global patterns of influenza A virus in wild birds // *Science.* – 2006. – Vol. 312. – P. 384-388.
13. Горин О.З., Ямникова С.С., Моисеенко Н.Н., Гусарова Н.А., Ковшаров А.Ф., Чипанин В.И., Солнцев И.Г., Щепин А.Ю. Итоги исследований по экологии вируса гриппа А на юге Восточной Сибири // В кн.: Природно-очаговые болезни человека. – Омск, 1991. – С. 110-117.
14. А.И. Кыдырманов. Вирусы гриппа, циркулирующие в популяциях морских млекопитающих гомарктики. Биотехнология. Теория и практика. 2014, №2, стр. 11-16 DOI: 10.11134/btp.2.2014.2
15. Munster V. J., Baas C., Lexmond P. et al. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds // *PLoS Pathogens* www.plospathogens.org 0630 May, 2007. – Vol. 3. – Issue 5 61
16. Грипп птиц в Сибири-2005: Лабораторные и эпидемиологические исследования, противоэпидемиологические и противоэпизоотические мероприятия в период эпизоотии вируса гриппа среди домашней птицы в Сибирском и Уральском федеральных округах Российской Федерации / Под ред. Г. Г. Онищенко. Новосибирск, 2006.
17. Львов Д. К., Ильичев В. Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекции. М., 1979.
18. Миграции птиц Восточной Европы и Северной Азии. Пластинчатоклювые. Речные утки / Под ред. В. В. Бианки, И. Н. Добрыниной. М., 1997

19. Kenji Tsukamoto, Hisayoshi Ashizawa, Koji Nakanishi, Noriyuki Kaji, Kotaro Suzuki, Masatoshi Okamatsu, Shigeo Yamaguchi, and Masaji Mase All Rights Reserved. Subtyping of Avian Influenza Viruses H1 to H15 on the Basis of Hemagglutinin Genes by PCR Assay and Molecular Determination of Pathogenic Potential. *Journal of clinical microbiology*, 2008, p. 3048–3055 Vol. 46, No. 9. doi:10.1128/JCM.02386-07.
20. Kenji Tsukamoto, Takayoshi Ashizawa, Koji Nakanishi, Use of Reverse Transcriptase PCR To Subtype N1 to N9 Neuraminidase Genes of Avian Influenza Viruses *J Clin Microbiol.* 2009; 47(7): 2301–2303.
21. Sanger E, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *PNAS*. 1977. Vol. 74. P. 5463–5467.
22. Шаршов К.А., Ли Синьсинь, Юрлов А.К., Шестопалов А.М. Экологическое разнообразие диких птиц – естественного резервуара вируса гриппа А на юге западной Сибири. *Журнал «Юг России: экология, развитие»*, Том 12, №44 2016. Стр 56 – 66.
23. Г.А. Данчинова А.В. Ляпунов М.А. Хаснатинов Э.Л. Разнообразие и распространение вирусов гриппа А среди птиц в восточной Сибири. *Ж. Экспериментальные исследования в биологии и медицине*. 2015. №5 (105).
24. Marchenko VY, Alekseev AY, Sharshov KA, Petrov VN, Silko NY, Susloparov IM, Shestopalov AM, Tserennorov D, Otgonbaatar D, Savchenko IA (2012). *Avian diseases*, 56 (1), 234–237.
25. Марченко В.Ю., Алексеев А.Ю., Ильиных Ф.А., Шаршов К.А., Савченко А.П., Карпова Н.В., Савченко И.А., Шестопалов А.М. Экология вируса гриппа в популяции диких птиц центральной Сибири (2008 г.) // *Проблемы и перспективы современной медицины, биологии и экологии: международная телеконф. -Томск, 2010. – С. 79–80.*
26. Ozawa M, Matsuu A, Tokorozaki K, Horie M, Masatani T, Nakagawa H, Okuya K, Kawabata T, Toda S. Genetic diversity of highly pathogenic H5N8 avian influenza viruses at a single overwintering site of migratory birds in Japan, 2014/15. *Euro Surveill.* 2015;20(20):p 21132.
27. Erik A. Karlsson, Hon S. Ip, Jeffrey S. Hall, Sun Woo Yoon, Jordan Johnson, Melinda A. Beck, Richard J. Webby, Stacey Schultz-Cherry. Respiratory transmission of an avian H3N8 influenza virus isolated from a harbour seal. *Nature Communications* volume 5, Article number: 4791 (2014).
28. Justin D Brown, Roy Berghaus, Taiana Costa. Intestinal Excretion of a Wild Bird-Origin H3N8 Low Pathogenic Avian Influenza Virus in Mallards (*Anas platyrhynchos*). 2012 *Journal of wildlife diseases* 48(4):991–8.
29. E.O. Tseren-Ochir, B. Damdinjav, T. Sharkhuu. Epidemiology of avian influenza viruses in wild birds in Mongolia. *The International Journal of Infectious Diseases.* 2010. Volume 14, Supplement 1, P. 164–165.
30. К. Х. Жуматов, М. Х. Саятов. Антигенный дрейф и молекулярно-генетическая изменчивость вирусов гриппа А/Н3 диких птиц, млекопитающих животных и человека. *Вестник Национальной Академии наук РК*. 2013 №2. Стр. 31 – 38.

References

1. Alexander D. J. A review of avian influenza in different bird species /D. J. Alexander // *Vet Microbiol.* 2000. – № 74(1–2). – С. 3–13.
2. Horimoto T. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses / T. Horimoto, Y. Kawaoka // *Clin Microbiol Rev.* -2001. № 14(1). – 129–149.
3. Jiang H, Wu P, Uyeki TM, He J, Deng Z, Xu W, Lv Q, Zhang J, Wu Y, Tsang TK, Kang M, Zheng J, Wang L, Yang B, Qin Y, Feng L, Fang VJ, Gao GF, Leung GM, Yu H and Cowling BJ, 2017. Preliminary Epidemiologic Assessment of Human Infections With Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N6) Virus, China. *Clinical Infectious Diseases*, 65, 383–388. doi:10.1093/cid/cix334
4. Kwon HI, Kim EH, Kim YI, Park SJ, Si YJ, Lee IW, Nguyen HD, Yu KM, Yu MA, Jung JH, Choi WS, Kwon JJ, Ahn SJ, Baek YH, Van Lai D, Lee OJ, Kim SW, Song MS, Yoon SW, Kim CJ, Webby RJ, Mo IP and Choi YK, 2018. Comparison of the pathogenic potential of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N6, and H5N8 viruses isolated in South Korea during the 2016–2017 winter season. *Emerg Microbes Infect*, 7, 29. doi:10.1038/s41426-018-0029-x
5. Huang Y., Tang H., Duffy S., Hong Y., Norman S., Ghosh M. et al. Multiplex Assay for Simultaneously Typing and Subtyping Influenza Viruses by Use of an Electronic Microarray // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – 47 (2). – P. 390–396.
6. Belov A. P., Ogarkov P. I. Zoonotic (avian) flu: dangers (view of epidemiologists) // *Epidemiology and vaccination.* – 2007. – No. 5 (22). Pp. 3–8.
7. Development of PCR methods for detection of avian influenza virus subtypes H3, H4, H5 and study of biological properties of virus isolates. Topic of dissertation and abstract on HAC of the Russian Federation 03.02.02, candidate of biological Sciences Babin Yu. Yu. 2012, Vladimir8. Khanna M, Kumar P, Choudhary K, Kumar B, Vijayan VK (2008). Emerging influenza virus: a global threat. *J. Biosci.*, 33 (4), 475–482.
9. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *CDC PLoS Pathog.*, 9 (10), e1003657.
10. Anthony S.J., et al. Emergence of fatal avian influenza in New England harbor seals // *mBio.* – 2012. – №3(4);
11. Litvinova O. M., Smorodintseva E. A., Deeva E. G., Lobova T. G., Konovalova N. I. Etiology of modern influenza // *Epidemiology and vaccination.* -2001. – No. 1. Pp. 5–9.
12. Olsen B., Munster V.J., Wallensten A., Waldenstrom J., Osterhaus A.D., Fouchier R. Global patterns of influenza A virus in wild birds // *Science.* – 2006. – Vol. 312. – P. 384–388.
13. Gorin O. Z., Yamnikova S. S., Moiseenko H. H., Gusarova H. A., Kovsharov A. F., Chipanin V. I., Solntsev I. G., Shepin A. Yu. Results of studies on the ecology of influenza A virus in the South of Eastern Siberia.: Natural focal diseases of man. – Omsk, 1991. Pp. 110–117.

14. A. I. Kydyrmanov. Influenza viruses circulating in the populations of marine mammals of the Holarctic. *Biotechnology. Theory and practice*. 2014, No. 2, pp. 11-16 DOI: 10.11134/btp.2.2014.2
15. Munster V. J., Baas C., Lexmond P. et al. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds // *PLoS Pathogens* www.plospathogens.org 0630 May, 2007. – Vol. 3. – Issue 5 61
16. Avian influenza in Siberia-2005: Laboratory and epidemiological studies, antiepidemiological and antiepidemiological measures in the period of epizootic influenza virus among poultry in the Siberian and Ural Federal districts of the Russian Federation / ed. G. G. Onishchenko. Novosibirsk, 2006.
17. L'vov D.K., Ilyichev V.D. Migrations of birds and transfer of pathogens of infection. M., 1979.
18. Migrations of birds in Eastern Europe and North Asia. Lamellar-billed. River Ducks / Ed. V.V. Bianchi, I.N. Dobrynya. M., 1997
19. Kenji Tsukamoto, Hisayoshi Ashizawa, Koji Nakanishi, Noriyuki Kaji, Kotaro Suzuki, Masatoshi Okamatsu, Shigeo Yamaguchi, and Masaji Mase All Rights Reserved. Subtyping of Avian Influenza Viruses H1 to H15 on the Basis of Hemagglutinin Genes by PCR Assay and Molecular Determination of Pathogenic Potential. *Journal of clinical microbiology*, 2008, p. 3048–3055 Vol. 46, No. 9. doi:10.1128/JCM.02386-07.
20. Kenji Tsukamoto, Takayoshi Ashizawa, Koji Nakanishi, Use of Reverse Transcriptase PCR To Subtype N1 to N9 Neuraminidase Genes of Avian Influenza Viruses *J Clin Microbiol*. 2009; 47(7): 2301–2303.
21. Sanger E., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *PNAS*. 1977. Vol. 74. P. 5463-5467.
22. Sharshov K. A., Li Xin Xin, Yurlov A. K., Shestopalov A. M. Ecological diversity of wild birds – a natural reservoir of influenza a virus in the South of Western Siberia. *Journal "South of Russia: ecology, development"*, Vol. 12, No. 44 2016. Pages 56-66.
23. G. A. Danchinova A.V. Lyapunov M. A. Khasnatinov E. L. Diversity and distribution of influenza a viruses among birds in Eastern Siberia. *J. Experimental research in biology and medicine*. 2015. No. 5 (105).
24. Marchenko VY, Alekseev AY, Sharshov KA, Petrov VN, Silko NY, Susloparov IM, Shestopalov AM, Tserennorov D, Otgonbaatar D, Savchenko IA (2012). *Avian diseases*, 56 (1), 234-237.
25. Marchenko V. Yu., Alekseev A. Yu., Ilyinykh F. A., Sharshov K. A., Savchenko A. P., Karpova N. V., Savchenko I. A., Shestopalov A. M. Ecology of the influenza virus in the wild bird population of Central Siberia (2008) // *Problems and prospects of modern medicine, biology and ecology: international teleconference*. – Tomsk, 2010. Pp. 79-80.
26. Ozawa M, Matsui A, Tokorozaki K, Horie M, Masatani T, Nakagawa H, Okuya K, Kawabata T, Toda S. Genetic diversity of highly pathogenic H5N8 avian influenza viruses at a single overwintering site of migratory birds in Japan, 2014/15. *Euro Surveill*. 2015;20(20):p 21132.
27. Erik A. Karlsson, Hon S. Ip, Jeffrey S. Hall, Sun Woo Yoon, Jordan Johnson, Melinda A. Beck, Richard J. Webby, Stacey Schultz-Cherry. Respiratory transmission of an avian H3N8 influenza virus isolated from a harbour seal. *Nature Communications* volume 5, Article number: 4791 (2014).
28. Justin D Brown, Roy Berghaus, Taiana Costa. Intestinal Excretion of a Wild Bird-Origin H3N8 Low Pathogenic Avian Influenza Virus in Mallards (*Anas Platyrhynchos*). 2012 *Journal of wildlife diseases* 48(4):991-8.
29. E.O. Tseren-Ochir, B. Damdinjav, T. Sharkhuu. Epidemiology of avian influenza viruses in wild birds in Mongolia. *The International Journal of Infectious Diseases*. 2010. Volume 14, Supplement 1, P. 164–165.
30. K. H. Zhumatov, M. H. Sayatov. Antigenic drift and molecular genetic variability of influenza a/H3 viruses in wild birds, mammals and humans. *Bulletin of The national Academy of Sciences*. 2013 No. 2. Pp. 31-38.