

**К.К. Джекебеков<sup>1\*</sup>, К.К. Акылбаева<sup>1</sup>, А.М. Мелисбек<sup>1</sup>,  
А.Т. Жунушов<sup>2</sup>, Е.Д. Бурашев<sup>1</sup>, М.Б. Орынбаев<sup>1</sup>,  
К.Т. Султанкулова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,  
Казахстан, пгт. Гвардейский

<sup>2</sup>Институт биотехнологии Национальной Академии Наук Кыргызской Республики,  
Кыргызстан. г. Бишкек

\*e-mail: zhekebekov\_87@mail.ru

## **ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ А/Н3N8**

Распространение вирусов гриппа А (ВГА) в природе неразрывно связано с миграционными перемещениями диких птиц, являющимся естественным резервуаром вируса гриппа птиц в природе. В работе представлены данные мониторинга территории Республики Казахстан в 2018–2019 гг., в ходе которого была выявлена циркуляция ВГА/ Н3N8 среди популяции диких птиц. Проанализированы изменения в генетической структуре поверхностных генов, циркулирующих на территории Республики Казахстан, пяти штаммов ВГА/Н3N8 и определена их филогенетическая принадлежность. Генетические расстояния поверхностных генов ВГА/Н3N8, выявленные с помощью программного обеспечения MEGA версии 6.0, показывают, что казахстанские штаммы дистанцируются от Азиатских и Европейских штаммов ВГА/Н3N8 и образуют отдельную ветвь, отличающуюся от прототипных штаммов. Возможно, данные казахстанские штаммы являются новыми вариантами ВГА/Н3N8. Пять казахстанских штаммов ВГА/Н3N8 и штаммы Евроазиатской генетической ветки также продемонстрировали филогенетическую близость по нуклеотидным последовательностям нейраминидазы. При этом генетическая дистанция между казахстанскими штаммами ВГА/Н3N8 и самым близким азиатским штаммом A/duck/Mongolia/566/2018(H3N8) MK978954 составила  $D \geq 0.015$ . Казахстанские штаммы дистанцируются от европейских штаммов, как A/mallard/Sweden/141811/2013 (H3N8) KT725427 со значением  $D \geq 0.027$ .

**Ключевые слова:** вирус гриппа, штамм, генетическое разнообразие.

K.K. Jekebekov<sup>1</sup>, K.K. Akylbayeva<sup>1</sup>, A.M. Melisbek<sup>1</sup>,  
A.T. Junushov<sup>2</sup>, E.D. Burashev<sup>1</sup>, M.B. Orynbayev<sup>1</sup>, K.T. Sultankulova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Biological Safety Problems, Kazakhstan, Gvardeiskiy vil.

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology of the National Academy of Science of the Kyrgyz Republic, Kyrgyzstan, Bishkek

\*e-mail: zhekebekov\_87@mail.ru

### **Genetic diversity of avian influenza virus strains A/H3N8**

The spread of influenza A viruses (IAV) in nature is inextricably linked to migratory movements of wild birds, which is a natural reservoir of avian influenza virus in nature. The paper presents monitoring data on the territory of the Republic of Kazakhstan in 2018–2019, during which the IAV/H3N8 circulation was detected among the wild bird population. Changes in the genetic structure of surface genes circulating on the territory of Kazakhstan of five IAV/H3N8 strains were analyzed and their phylogenetic affiliation was determined. The genetic distances of the IAV/H3N8 surface genes identified using the MEGA software version 6.0 show that Kazakhstani strains distance themselves from the Asian and European IAV/H3N8 strains and form a separate branch that differs from the prototype strains. Perhaps these Kazakhstani strains are new variants of IAV/H3N8. Five Kazakhstan HAV / H3N8 strains and strains of the Eurasian genetic branch also demonstrated phylogenetic closeness in the nucleotide sequences of neuraminidase. Moreover, the genetic distance between the Kazakhstani strains of the HAV / H3N8 and the closest Asian strain A / duck / Mongolia / 566/2018 (H3N8) MK978954 was  $D \geq 0.015$ . Kazakhstani strains distance themselves from European strains like A / mallard / Sweden / 141811/2013 (H3N8) KT725427 with a value of  $D \geq 0.027$ .

**Key words:** influenza virus, strain, genetic diversity.

К.К. Джекебеков<sup>1\*</sup>, К.К. Акылбаева<sup>1</sup>, А.М. Мелисбек<sup>1</sup>,  
А.Т. Жунушов<sup>2</sup>, Е.Д. Бурашев<sup>1</sup>, М.Б. Орынбаев<sup>1</sup>, К.Т. Султанкулова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты,  
Қазақстан, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, қ.т.а. Гвардейский

<sup>2</sup>Қырғыз Республикасы Ұлттық ғылым академиясының биотехнология институты, Қырғызстан, Бішкек қ.

\*e-mail: zhekebekov\_87@mail.ru

### А/Н3N8 құс тұмауы вирусы штамдарының генетикалық әртүрлілігі

А типті құс тұмауы вирусының (АТТВ) табиғатта таралуы құс тұмауы вирусының табиғи резервуары болып табылатын жабайы құстардың қоныс аударуымен өте тығыз байланысты болып табылады. Ғылыми жұмыс барысында жабайы құстардың популяциясы арасында АТТВ/Н3N8 айналымы анықталып, 2018-2019 жылдардағы Қазақстан Республикасы бойынша мониторинг деректері берілген. Қазақстан аумағында бес АТТВ/Н3N8 штамдарының айналымы, олардың гендерінің генетикалық құрылымындағы өзгерістері талданып, филогенетикалық құрамы анықталған. MEGA бағдарламалық жасақтамасының 6.0 нұсқасымен анықталған АТТВ/Н3N8 гендерінің генетикалық қашықтықтары қазақстандық штамдардың Азия және Еуропалық АТТВ/Н3N8 штамдарынан қашықтықта екенін және сонымен қатар прототипті штамдарынан өзгеше тармақты құрайтындығын көрсетеді. Мүмкін, бұл қазақстандық штамдар АТТВ/Н3N8 жаңа нұсқалары болып табылады. Қазақстандық бес АТТВ/Н3N8 штамдары және Еуразиялық генетикалық саланың штамдары нейраминидаздың нуклеотидтік тізбегінде филогенетикалық жақындығын көрсетіп берді. Сонымен қатар, ғылыми жұмыс негізінде қазақстандық А типті құс тұмауы вирусының АТТВ/Н3N8 штамдары мен Азиядағы A/duck/Mongolia/566/2018(Н3N8) МК978954 штамдарының арасындағы генетикалық қашықтық  $D \geq 0.015$  болып табылады. Қазақстандық штамдар, A/mallard/Sweden/141811/2013 (Н3N8) КТ725427 сияқты Еуропалық штамдардан  $D 0.027$  мәні бар қашықтықта тұрғандығын көрсетті.

**Түйін сөздер:** тұмауы вирусы, штамм, генетикалық әртүрлілік.

### Введение

За последние 50 лет зарегистрировано 18 наиболее крупных эпизоотий высокопатогенного вируса гриппа птиц. Из них, 5 произошло в Великобритании, 5 в Австралии, 3 случая в других странах Европы, и по одной эпизоотии в Пакистане, Гонконге, Канаде, США и Мексике [1].

С 2005 года во многих странах регистрируют птичий грипп, вызванный высокопатогенным вирусом штамма H5N1, занесенный с дикой перелетной и водоплавающей птицей. Вирус-возбудитель птичьего гриппа (Influenza virus A) относится к семейству Orthomyxoviridae, по племент связывающему антигену родствен к вирусу гриппа А человека и животных.

Вирус гриппа А является представителем рода Orthomyxovirus [2,3, 4]. Одноцепочечная РНК отрицательного смысла имеет 8 генных сегментов, кодирующих 11 белков, в которых 2 поверхностных гликопротеина гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА) несут 16 и 9 серотипов соответственно. Еще два подтипа НА (H17 и H18) и NA (N10 и N11) были выделены от травоядных летучих мышей [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10].

Для птиц наиболее патогенны варианты типа А (H5N1 и H7N9). Заражение человека впервые зарегистрировано в Гонконге в 1997 году во вре-

мя вспышки гриппа у домашней птицы (H5N1). Случаи заражения гриппом H7N9 зафиксированы в Китае 2013 году, зафиксировано 453 случаев болезни человека данным вирусом. От гриппа скончались 175 человек [11, 12, 13].

Подтип H3 вируса птичьего гриппа может обеспечить гены для вируса человеческого гриппа посредством генной реассортировки, что вызывает большие опасения относительно его потенциальной угрозы для здоровья человека [14].

По данным Всемирной организации здоровья животных (OIE) от 25 января 2018 года отмечено, что с 2013 года наблюдается вторая панэпизоотическая волна гриппа птиц. Ситуацию осложняет циркуляция различных подтипов вируса, что усложняет контроль и ликвидацию вспышек вызываемым птичьим гриппом. В январе 2018 года 8 стран (Афганистан, Камбоджа, Тайвань, Ирак, Южная Корея, Япония, Саудовская Аравия и Южная Африка) и два континента (Азия и Африка) были поражены вспышками среди домашней птицы.

По сравнению с первой волной (с 2005 по 2012 годы) в настоящее время отмечается утроение числа циркулирующих подтипов вируса гриппа птиц (12 против 4). Текущей панэпизоотией охвачены все континенты. Погибло около 120 миллионов голов птицы. В 68 странах наблюдалась хотя бы одна вспышка гриппа птиц.

Такие штаммы, как H5N1, H5N2 и H5N8 сегодня являются обычными для этих стран [15].

Совсем недавно новые и возвращающиеся штаммы H5N1, H5N2 и H5N6 поразили Азию, Европу и Ближний Восток, и имеются признаки того, что географическое распространение продолжается. С позиций здравоохранения, наиболее опасными для человека являются штаммы H7N9, H5N6 и H5N1 [16].

Особо опасные для человека вирусы гриппа птиц были выделены в Китае (H7N9 и H5N7) и в некоторых регионах Азии и Африки (H5N1) [17].

Грипп является заболеванием, вызываемым вирусом гриппа птиц, постоянная эволюция которого приводит к непрекращающимся ежегодным эпидемиям и эпизоотиям. В основе эволюции вирусов гриппа лежит накопление мутаций, вызывающие антигенный дрейф и возникновение новых вариантов вируса, что обеспечивает гетерогенность вирусной популяции и лежит в основе формирования различных генетических линий [18, 19, 20].

Дикие водоплавающие птицы считаются природным источником всех вирусов гриппа А. Возможно, на протяжении веков именно они являлись распространителями вирусов данного заболевания. Перелетные птицы известны как носители вирусов подтипов H5 и H7, хотя обычно не в столь агрессивной патогенной форме. Последние случаи заболевания свидетельствуют

о том, что некоторые перелетные птицы непосредственно распространяют вирус H5N1 в высокопатогенной форме [21]. В этой связи прогнозируется распространение данного вируса в новых регионах. Поэтому проблема сезонных миграций в пограничных районах приобретает особую актуальность.

Таким образом, целью настоящего исследования является определение генетического разнообразия вариантов ВГА субтипа H3N8, циркулировавшие в популяциях диких птиц в 2018 – 2019 гг. на территории мелких озер, расположенных на территории Северо-Казахстанской области и орнитологической станции «Шакпак».

### Материалы и методы исследования

*Штаммы, используемые в исследовании, были выявлены на территории Республики Казахстан в 2018 -2019 гг. среди популяции диких птиц:*

- A/Northern shoveler / Nort-Kazakhstan / 20 / 2018 (H3N8);
- A/Garganey/Nort-Kazakhstan/45/2018 (H3N8);
- A/Greylag goose/Nort-Kazakhstan/62/2019 (H3N8);
- A/White wagtail/Shackpack/49/2019 (H3N8).

Штаммы, используемые в исследовании продемонстрированы в таблице 1. Приведенные сведения показывают видовой состав птиц, от которых выделены штаммы, место выделения.

**Таблица 1** – Характеристики штаммов вируса гриппа птиц

№	Штаммы	Вид птицы	Семейство	Дата сбора	Место выделения	Источник образца	Координаты места сбора
1	A/grey duck/ Nort-Kazakhstan/5/ 2018 (H3N8)	серая утка (Grey duck)	Утиные	01.10.2018	Северо-Казахстанская область, Есильский район, п. Явленка, озеро Алуа	Клоакальные смывы	N54°22'50,6» E68°17'06,6»
2	A/Northern shoveler/Nort-Kazakhstan/20/2018 (H3N8)	широконоска (Northern shoveler)	Утиные	04.10.2018	Северо-Казахстанская область, Есильский район, п. Явленка, озеро Алуа	Клоакальные смывы	N54°22'50,6» E68°17'06,6»
3	A/Garganey/ Nort-Kazakhstan/45/2018 (H3N8)	чирок-трескунок (Garganey))	Утиные	03.10.2018	Северо-Казахстанская область, Жамбылский район, с. Пресновка Озеро Займище	Клоакальные смывы	N54°22'50,6» E68°17'06,6»
4	A/ Greylag goose/ Nort-Kazakhstan/62/2019 (H3N8)	серый гусь (Greylag goose)	Утиные	20.10.2019	Северо-Казахстанская область, Тимирязевский район, с Акжан, Озеро Малый Как	Клоакальные смывы	N 53°43'39,2» E066°48'18,7»
5	A/White wagtail/ Shackpack/49/ 2019 (H3N8)	белая трясогузка (White wagtail)	Трясогузковые	29.10.2019	Орнитологическая станция кольцевания птиц «Шакпак», Жамбылская область	Клоакальные смывы	N42° 57,095 E070°64,366

### 2.1 Выделение вирусной РНК

Выделение вирусной РНК проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) в соответствии протоколу производителя.

### 2.2 ОТ-ПЦР-реакция

ОТ-ПЦР проводили с использованием одностадийного набора для постановки ПЦР (Qiagen). Все праймеры были синтезированы с помощью синтезатора ДНК/РНК/LNA H-16

(K&A Laborgeraete, Германия). Последовательности праймеров, использованные в этом исследовании, показаны в таблице 2.

Определение подтипов гемагглютинина Н3 и нейраминидазы N8, выделенных штаммов проводили методом ОТ-ПЦР с использованием подтип специфичных праймеров [20, 21].

Полученный продукт ПЦР анализировали с использованием электрофореза в агарозном геле (1,5%).

**Таблица 2** – Список праймеров для выявления ВГА/Н3N8

Наименование	Последовательность	Размер продукта, п.о.
Вирус гриппа типа А	InfA_780_1F- ACT GGG CAC GGT GAG CGT GA	164
	InfA_944_1RCCC GTC AGG CCC CCT CAA AGC	
Праймеры, используемые для субтипирования гена НА и NA ВГА/Н3N8		
Н3	H3-919F GYATYACTCCWAATGGAAGC	376
	H3-1294R ATTCTYCCTTCYACTTCDGA	
N8	N8-93F CATRTVGTBAGYATYAYARTAAC	137
	N8-209R ACAYTRGYATTGTRCCATTG	

### 2.3 Секвенирование и филогенетический анализ

Гемагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа А/Н3N8, обнаруженные с помощью ОТ-ПЦР, подвергались нуклеотидному секвенированию на автоматическом секвенаторе ДНК Applied Biosystems 3130 (ABI, 3130, США) с использованием набора для секвенирования Bigdye Terminator V3.1 (Applied Biosystems, Inc., США) для секвенирования генов. Расчет генетических дистанции выполнили с использованием компьютерной программы Mega 7.0 при следующих параметрах: Analysis – Distance Estimation; Variance Estimation Method – Bootstrap method; Model/Method – P distance [22, 23, 24].

### Результаты исследования и их обсуждение

#### 3.1 ПЦР анализ субтипов ВГА/Н3N8

В Северо-Казахстанской области ВГА/Н3N8 осенью 2018 -2019 гг. был выявлен у четырех видов птиц, принадлежащих к семейству утиных (Anatidae): серая утка (Grey duck), широконоска (Northern shoveler), чирок-трескунок (Garganey) и серый гусь (Greylag goose). Следует отметить, что птицы, относящиеся к семействам Anatidae и Anseriformes, занимают один из первых мест по количеству и разнообразию изолируемых от них вирусов гриппа типа А [25].

На территории орнитологической станции кольцевания птиц «Шакпак», расположенной в южной части Жамбылской области Республики Казахстан ВГА/Н3N8 был выявлен у птицы белая трясогузка (White wagtail).

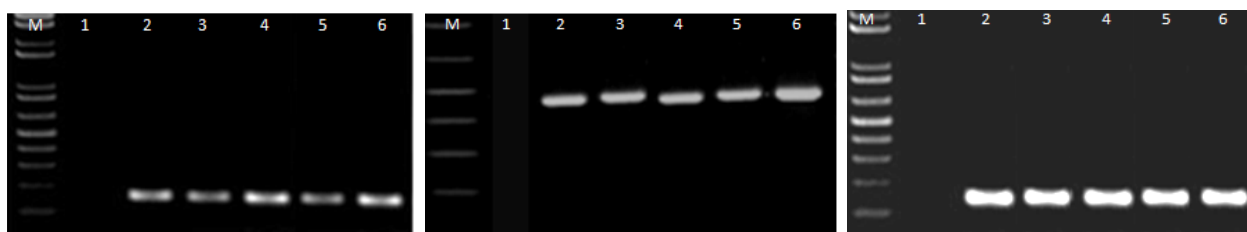
Результаты выявления ВГА/Н3N8 из образцов от птиц представлены на рисунке 1.

#### 3.2 Филогенетический анализ поверхностных генов

Проведен филогенетический анализ по гену НА (Рисунок 2) выделенных штаммов ВГА/Н3N8 с целью определения наиболее филогенетически близких к ним. В анализе были использованы доступные в GenBank данные штаммов ВГА.

Штаммы ВГА/Н3N8, выделенные в Казахстане в 2018-2019 гг., относящиеся к азиатской линии отмечены треугольниками. Штаммы ВГА/Н3N8, относящиеся к европейской линии, выделены кругом.

В результате проведенного филогенетического анализа показано, что данные штаммы вируса гриппа птиц подтипа Н3N8 входят в группы азиатских и европейских вирусов. Отличия нуклеотидных последовательностей гемагглютинина между казахстанскими представителями вируса гриппа птиц подтипа Н3N8 этих двух генетических линий достигают значений 5,75 %.



Электрофореграмма ПЦР-продуктов М гена вируса гриппа А. Размер ПЦР продукта 185 п.о.; М – Маркер ДНК; 1 – Отрицательный контроль; 2 – A/grey duck/ Nort-Kazakhstan/5/2018 (H3N8); 3 – A/Northern shoveler/Nort-Kazakhstan/20/2018 (H3N8); 4 – A/Garganey/Nort-Kazakhstan/45/2018 (H3N8); 5 – A/ Greylag goose/Nort-Kazakhstan/62/2019 (H3N8); 6 – A/White wagtail/Shackpack/49/2019 (H3N8).

Электрофореграмма ПЦР-продуктов гемагглютинина Н3. Размер ПЦР продукта 376 п.о.; М – Маркер ДНК; 1 – Отрицательный контроль; 2 – A/grey duck/ Nort-Kazakhstan/5/2018 (H3N8); 3 – A/Northern shoveler/Nort-Kazakhstan/20/2018 (H3N8); 4 – A/Garganey/Nort-Kazakhstan/45/2018 (H3N8); 5 – A/ Greylag goose/Nort-Kazakhstan/62/2019 (H3N8); 6 – A/White wagtail/Shackpack/49/2019 (H3N8).

Электрофореграмма ПЦР-продуктов нейраминидазы N8. Размер ПЦР продукта 137 п.о. п.о.; М – Маркер ДНК; 1 – Отрицательный контроль; 2 – A/grey duck/ Nort-Kazakhstan/5/2018 (H3N8); 3 – A/Northern shoveler/Nort-Kazakhstan/20/2018 (H3N8); 4 – A/Garganey/Nort-Kazakhstan/45/2018 (H3N8); 5 – A/ Greylag goose/Nort-Kazakhstan/62/2019 (H3N8); 6 – A/White wagtail/Shackpack/49/2019 (H3N8).

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов фрагментов генов М, Н3 и N8 вируса гриппа типа А.

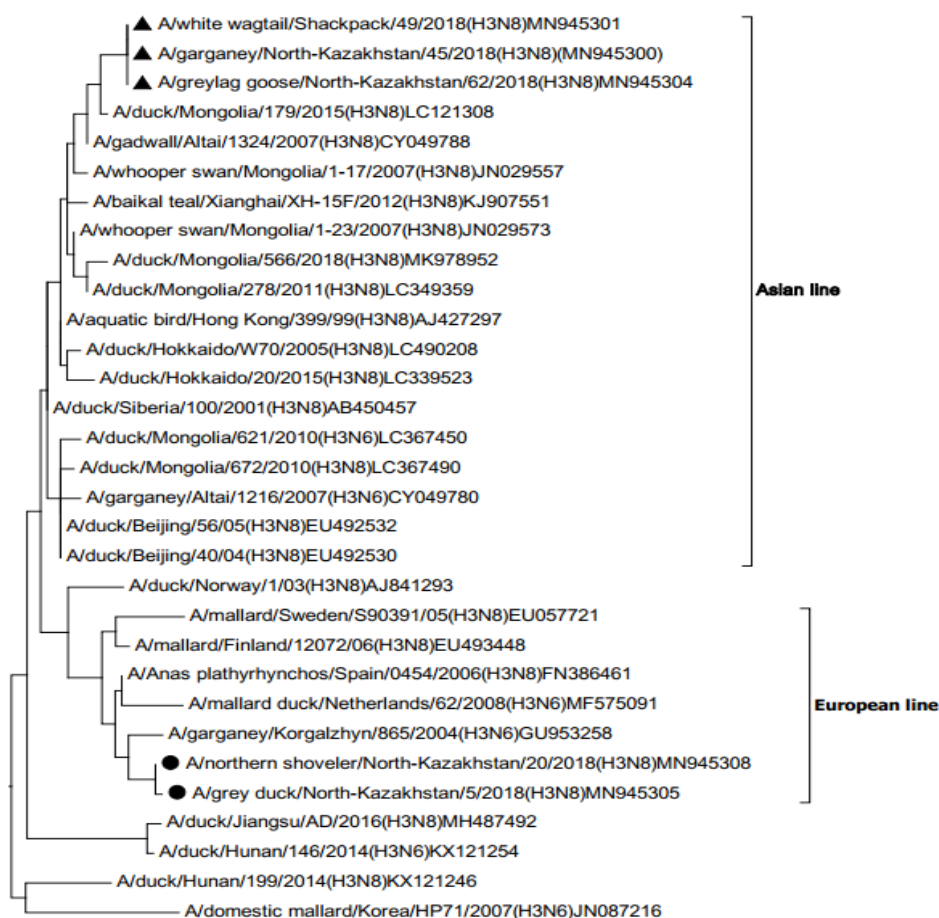


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево штаммов ВГА/Н3N8 по гену НА, 2018/2019 (n = 5) (www.megasoftware.net/)

### 3.3 Оценка генетической связи штаммов ВГА/Н3N8

Проведена оценка эволюционной дивергенции между последовательностями казахстанских штаммов и данными Генбанка в программе MEGA6.0. Показано количество базовых различий между нуклеотидными последовательностями казахстанских штаммов ВГА/Н3N8 и

Азиатских, Европейских штаммов из Генбанка. Стандартные оценки ошибок показаны выше диагонали и были получены с помощью процедуры начальной загрузки (1000 повторов).

По данным таблиц 3, 4, 5 выборки из популяций казахстанских штаммов ВГА/Н3N8 дистанцируются от Азиатских и Европейских штаммов представленных в Генбанке.

**Таблица 3** – Генетическая дифференциация гемагглютинаина штаммов ВГА/Н3N8 Азиатской генетической линии

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. A/greylag goose/North-Kazakhstan/62/2019(Н3N8)MN945304		0.001	0.000	0.003	0.005	0.003	0.004	0.005
2. A/white wagtail/Shackpack/49/2019(Н3N8)MN945301	0.003		0.001	0.003	0.005	0.004	0.004	0.005
3. A/garganey/North-Kazakhstan/45/2018(Н3N8)MN945300	0.000	0.003		0.003	0.005	0.003	0.004	0.005
4. A/duck/Mongolia/179/2015(Н3N8)LC121308	0.015	0.018	0.015		0.005	0.003	0.004	0.005
5. A/baikal teal/Xianghai/XH-15F/2012(Н3N8)KJ907551	0.034	0.036	0.034	0.031		0.004	0.003	0.004
6. A/gadwall/Altai/1324/2007(Н3N8)CY049788	0.024	0.026	0.024	0.021	0.025		0.003	0.004
7. A/whooper swan/Mongolia/1-23/2007(Н3N8)JN029573	0.032	0.034	0.032	0.030	0.018	0.021		0.003
8. A/duck/Mongolia/566/2018(Н3N8)МК978952	0.043	0.045	0.043	0.040	0.029	0.031	0.014	

Попарные значения генетической дифференциации (таблица 3) на основе гемагглютинаина показали, что казахстанские штаммы значи-

тельно дистанцируются от Азиатского штамма A/duck/Mongolia/179/2015(Н3N8) LC121308 ( $D \geq 0.015$ ).

**Таблица 4** – Генетическая дифференциация гемагглютинаина штаммов ВГА/Н3N8 Европейской генетической линии

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. A/northern shoveler/North-Kazakhstan/20/2018(Н3N8)MN945308		0.003	0.009	0.010	0.009	0.011	0.013	0.014
2. A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(Н3N8)MN945305	0.003		0.009	0.011	0.009	0.011	0.013	0.014
3. A/garganey/Korgalzhyn/865/2004(Н3N6)GU953258	0.029	0.026		0.011	0.009	0.011	0.012	0.014
4. A/mallard duck/Netherlands/62/2008(Н3N6)MF575091	0.038	0.042	0.045		0.009	0.012	0.014	0.015
5. A/Anas platyrhynchos/Spain/0454/2006(Н3N8)FN386461	0.022	0.026	0.026	0.029		0.008	0.011	0.012
6. A/mallard/Finland/12072/06(Н3N8)EU493448	0.038	0.042	0.042	0.051	0.022		0.010	0.013
7. A/mallard/Sweden/S90391/05(Н3N8)EU057721	0.058	0.061	0.054	0.070	0.048	0.038		0.015
8. A/duck/Norway/1/03(Н3N8)AJ841293	0.061	0.064	0.070	0.080	0.051	0.054	0.080	

Согласно полученным данным таблицы 4, последовательность гемагглютинаина, показала большое сходство между казахстанскими штаммами ВГА/Н3N8 и штаммами A/garganey/Korgalzhyn/865/2004(Н3N6)GU953258 ( $D \geq 0.026$ ) и A/Anas platyrhynchos/Spain/0454/2006(Н3N8)FN386461 ( $D \geq 0.022$ ).

При этом генетические различия между другими относительно близкими европейскими штаммами по этому маркеру более значительны. Например, между казахстанскими штаммами ВГА/Н3N8 и штаммом A/duck/Norway/1/03(Н3N8)AJ841293 генетические дистанции составили  $D \geq 0.061$ .

Пять казахстанских штаммов ВГА/Н3N8 и штаммы Евроазиатской генетической ветки также продемонстрировали филогенетическую близость по нуклеотидным последовательностям нейраминидазы. При этом генетическая дистанция между казахстанскими штаммами ВГА/Н3N8 и самым близким азиатским штаммом A/duck/Mongolia/566/2018(Н3N8)МК978954 составил  $D \geq 0.015$ . Казахстанские штаммы дистанцируются от европейских штаммов, как A/mallard/Sweden/141811/2013 (Н3N8)КТ725427 со значением  $D \geq 0.027$ .



Таблица 5 – Генетическая дифференциация нейраминидазы штаммов ВГА/Н3N8 Евроазиатской генетической ветки

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. A/greylag goose/North-Kazakhstan/62/2018(H3N8)MN945303	0.000	0.000	0.000	0.002	0.003	0.004	0.005	0.004	0.007
2. A/garganey/North-Kazakhstan/45/2018(H3N8)MN945299	0.000	0.000	0.000	0.002	0.003	0.004	0.005	0.004	0.007
3. A/white wagtail/Shackpack/49/2018(H3N8)MN945302	0.000	0.000	0.000	0.002	0.003	0.004	0.005	0.004	0.007
4. A/grey duck/North-Kazakhstan/5/2018(H3N8)MN945306	0.006	0.006	0.006	0.006	0.002	0.004	0.005	0.004	0.007
5. A/northern shoveler/North-Kazakhstan/20/2018(H3N8)MN945307	0.009	0.009	0.009	0.003	0.003	0.004	0.005	0.005	0.007
6. A/duck/Mongolia/566/2018(H3N8)МК978954	0.015	0.015	0.015	0.015	0.018	0.005	0.005	0.006	0.006
7. A/mallard/Sweden/141811/2013(H3N8)КТ725427	0.027	0.027	0.027	0.027	0.029	0.029	0.005	0.006	0.006
8. A/duck/Mongolia/278/2011(H3N8)LC349361	0.023	0.023	0.023	0.023	0.026	0.025	0.023	0.006	0.006
9. A/Anas platyrhynchos/Spain/0454/2006(H3N8)FN386468	0.047	0.047	0.047	0.047	0.050	0.048	0.046	0.044	0.044

Распространение вирусов гриппа птиц в природе неразрывно связано с миграционными перемещениями диких птиц, являющимися естественными резервуарами вируса гриппа птиц в природе. В работе представлены данные по изучению генетического разнообразия штаммов ВГА/Н3N8, выявленных на территории Республики Казахстан в 2018 -2019 гг. среди популяции диких птиц.

Во время сезонных миграций, являющиеся естественным резервуаром вируса гриппа птиц в природе, дикие птицы способны переносить вирус на значительные расстояния.

На территории Казахстана, где сходятся миграционные потоки птиц, зимующих в различных регионах мира – Европе, Африке, на Ближнем Востоке и в Средней Азии, высока вероятность появления реассортантных штаммов между вирусами гриппа человека и животных.

Количество видов птиц в Казахстане достаточно велико, а у каждого вида есть свои специфические особенности, области зимовок, направления пролета, поведение на нем. Поэтому составление полной картины миграций птиц в Казахстане крайне трудно. На рисунке 2 представлена фенология осенней миграции птиц по территории Республики Казахстан (<http://www.fao.org/docs/eims/upload/267122>).

Большинство птиц Казахстана совершают настоящие перелеты, проводя зиму в далеких странах, часто за много тысяч километров от места гнездования. Кроме того, через Казахстан пролетают многие виды птиц, места гнездовий которых находятся севернее нашей республики – в тайге и тундре. На рисунке 3 представлена фенология весенней миграции птиц по территории Республики Казахстан (<http://www.fao.org/docs/eims/upload/267122>).

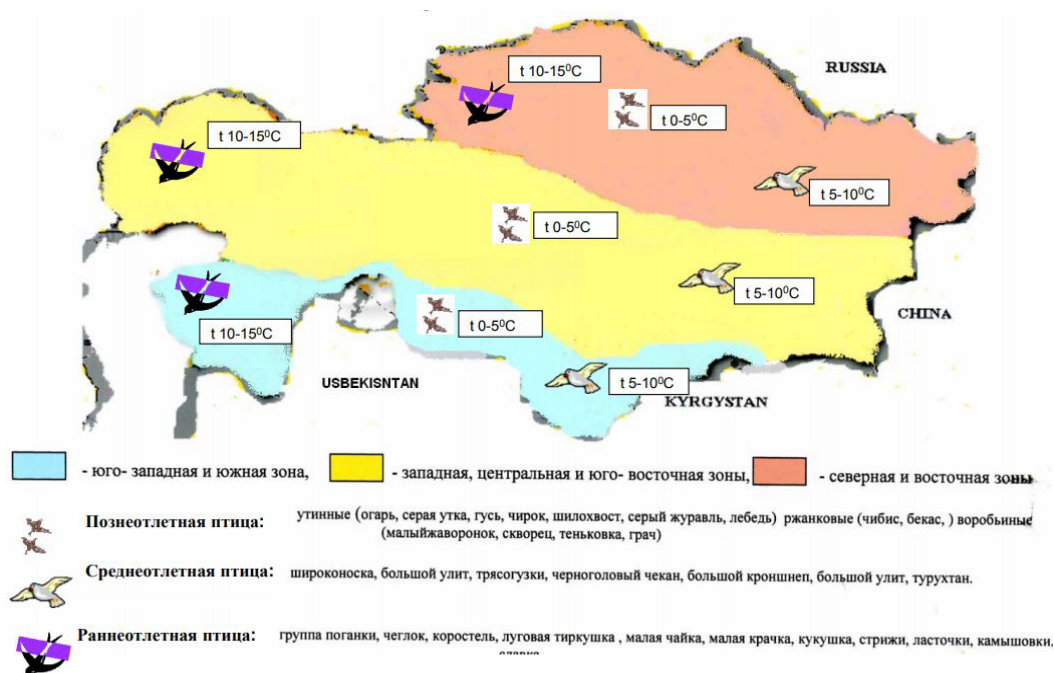


Рисунок 2 – Осенняя миграция птиц по территории Республики Казахстан



Рисунок 3 – Весенняя миграция птиц по территории Республики Казахстан

Территория Республики Казахстан играет важную географическую роль в распространении вируса гриппа, способствуя его переносу дикими птицами из разных стран.

Вирусы гриппа подтипа H3, известные как имеющие широкий спектр хозяев от птиц до различных видов млекопитающих, включая людей, свиней, собак и лошадей, быстро развиваются в результате антигенного дрейфа и антигенного сдвига [26, 27, 28, 29, 30, 31].

### Заключение

Полученные данные о зараженности вирусом гриппа А диких птиц на территории Республики Казахстан и данные филогенетического анализа штаммов вируса гриппа, выделенных от птиц на этой территории, могут быть использованы для

прогнозирования эпизоотической ситуации по гриппу птиц.

Одновременная циркуляция азиатской и европейской двух генетических линий ВГА/Н3N8 у диких птиц в одной местности обусловлена занесением их из разных географических мест. Генетические расстояния, выявленные с помощью нуклеотидных последовательностей поверхностных генов ВГА/Н3N8, показывают, что казахстанские штаммы дистанцируются от Азиатских и Европейских штаммов ВГА/Н3N8 и образуют отдельную ветвь, отличающихся от прототипных штаммов.

### Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

### Литература

- 1 Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T. M., Herfst S., Simth D., Rimmelzwaan G. F., Olsen B., Osterhaus A. D. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls // *J. Virol.* – 2005 – Vol.79 – P. 2814–2822.
- 2 Blinov V.M., Kiselev O.I. An analyses of the potential areas of recombination in the hemmagglutinin genes of animal influenza viruses in relation to their adaptation to a new host-man // *Vopr. Virusol.* – 1993. – Vol.38, No 6. – P. 263-268.
- 3 Boom R., Sol C., Salimans M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // *J. Clin Microbiol.* – 1990. – Vol. 28. – P. 495-503.
- 4 Flandorfer A., Garcia-Sastre A., Basler C. and Palese P. Chimeric influenza A viruses with a functional influenza B virus neuraminidase or hemagglutinin // *J. Virol.* – 2003. – Vol.77. – P. 9116-9123.



- 5 Bin Zhou, Matthew E. Donnelly., Derek T. Scholes, Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses // *J. Virol.* – 2009 Oct. – Vol. 83(19). – P. 10309-10313.
- 6 Kida H., Ito T., Yasuda J. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs // *J Gen Virol.* – 1994. – Vol.74. – P.2183-2188.
- 7 WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza – WHO. 2011.20. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, DIE, 2009
- 8 Lee, C.W. Avian influenza virus C.W. Lee, Y.M. Saif – *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 32. – P. 301-310.
- 9 Wu Y., Tefsen B., Shi Y. & Gao G. F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11 // *Trends Microbiol* – 2014 – Vol.22 – P. 183–191.
- 10 Spackman E. Avian influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR // *J. Methods Mol Biol.* – 2014. – Vol. 1161. – P. 105-108.
- 11 Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M. & Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses // *Curr Top Microbiol Immunol* -1992-. Vol.56 – P.152–179
- 12 Fouchier R.A. et al. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene // *J Clin Microbiol.* – 2000. – Vol.38. – P. 4096-4101.
- 13 Lupiani B. and Reddy S.M., Lamont S J, H Zhou RNA-seq Analysis Revealed Novel Genes and Signaling Pathway Associated With Disease Resistance to Avian Influenza Virus Infection in Chickens – 2013-03557. 2015.
- 14 Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T, Suarez D.L. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes // *J Clin Microbiol* -2002- Vol.40: . – P.632, 3256–3260.
- 15 Xie Z., Xie L., Zhou C., Liu J., Pang Y., Deng X., Xie Z., Fan Q. Complete genome sequence analysis of an H6N1 avian influenza virus isolated from Guangxi pockmark ducks // *J. Virol.* – 2012 -Vol.86 – P.13868–13869.
- 16 Webster R., Cox N., Stohr K.WHO Manual 011 Animal Influenza Diagnosis and Surveillance Global Influenza Programmer // World Health Organization, Switzerland – 2010 – P.99.
- 17 Xie Z., Guo J., Xie L., Liu J., Pang Y., Deng X., Xie Z., Fan Q., Luo S. Complete genome sequence of a Novel reassortant Avian Influenza H1N2 virus isolated from a domestic sparrow in 2012 // *Genome Announc.* -2013- 1(4):e00431-13. 10.1128/genomeA.00431-13. 1128/JVI.02700-12.
- 18 Wright S.M., Kawaoka Y., Sharp G.B. Interspecies transmission and reassortment of influenza Aviruses in pigs and turkeys in United States // *Am J Epidemiol.* – 1992. – Vol. 136. – P. 448-97.
- 19 Hiromoto Y., Yamazaki Y., Fukushima T. Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus // *J Gen Virol.* – 2000. – Vol.81. – P. 1293-1303.
- 20 Sklyarenko S.L. Research on Important Bird Areas in Kazakhstan and Middle Asia // *Almaty*, 2016. – 227 p.
- 21 Webster R.G., Yakhno M., Hinshaw V.S., WJ Bean , Murti KG Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks // *Virology.* – 1978. – Vol. 84. – P. 268-276.
- 22 Бакулин В.А. Грипп птиц. Международная специализированная конгресс выставка // «Ветеринария, зоотехния». – СПб., 2005. Выпуск 1. – 4 с.
- 23 Данчинова Г.А., Ляпунов А.В., Хаснатинов М.А. Разнообразие и распространение вирусов гриппа А среди птиц в восточной Сибири // *Экспериментальные исследования в биологии и медицине.* – 2015. – 5 (105).
- 24 Шаршов К.А., Ли Синьсинь, Юрлов А.К., Шестопалов А. М. Экологическое разнообразие диких птиц – естественного резервуара вируса гриппа А на юге западной Сибири // *Юг России: экология, развитие.* – 2018. – Т. 12 (44). – С. 56-66
- 25 Султанкулова К.Т., Акылбаева К.К., Кожабегенов Н.С., Кыдырбаев Ж.К., Орынбаев М.Б. Выявление вируса гриппа А/Н5 у диких птиц // *Вестник Государственного Университета имени Шакарима города Семей.* – 2019. – 2. – С. 296-299.
- 26 Kumar S., Stecher G., and Tamura K MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Molecular Biology and Evolution* – 2016- Vol.33- P.1870-1874.
- 27 Kamps B.S., Hoffmann C., Preiser W. Influenza Report 2006 / B. S. Kamps, C. Hoffmann, W. Preiser W. – Flying Publisher, 2006.
- 28 Alexander D.J. An overview of the epidemiology of avian influenza // *Vaccine* – 2007. – Vol. 25(30). – P. 5637-5644.
- 29 Munster V.J., Baas C., Lexmond P., Waldenström J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan GF, Beyer WE, Schutten M, Olsen B, Osterhaus AD, Fouchier RA. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds // *PLoS. P.* – 2007. – Vol. 3(5). – P. e61.
- 30 Prosser D.J., Cui P., Takekawa J.Y., Tang M, Hou Y, Collins BM, Yan B, Hill NJ, Li T, Li Y, Lei F, Guo S, Xing Z, He Y, Zhou Y, Douglas DC, Pery WM, Newman SH. Wild bird migration across the Qinghai-Tibetan plateau: a transmission route for highly pathogenic H5N1 // *PLoS. One.* – 2011. – Vol. 6. – P. e17622.
- 31 Webster R.G. The importance of animal influenza for human disease // *J. Vac.* – 2002. – Vol. 20, No. 2. – P.16-20.

## References

- 1 Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Simth D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D. “Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls”, *J. Virol.* (2005): 79:2814–2822.

- 2 Blinov, V.M., Kiselev, O.I. "An analyses of the potential areas of recombination in the hemmagglutinin genes of animal influenza viruses in relation to their adaptation to a new host-man" *Vopr. Virusol.* Vol.38, No 6 (1993): 263-268.
- 3 Boom, R., Sol, C., Salimans, M. "Rapid and simple method for purification of nucleic acids" *J. Clin Microbiol.* Vol. 28 (1990): 495-503.
- 4 Flandorfer, A., Garcia-Sastre, A., Basler, C. and Palese P. "Chimeric influenza A viruses with a functional influenza B virus neuraminidase or hemagglutinin" *J. Virol.* Vol.77 (2003): 9116-9123.
- 5 Bin Zhou, Matthew, E., Donnelly., Derek T. Scholes, "Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses" *J. Virol.* Vol. 83(19) (2009 Oct): 10309-10313.
- 6 Kida, H., Ito, T., Yasuda, J. "Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs" *J Gen Virol.* Vol.74 (1994): 2183-2188.
- 7 WHO. "Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza" WHO. 2011.20. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals DIE, (2009)
- 8 Lee, C.W. "Avian influenza virus C.W. Lee, Y.M. Saif" *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 32 (2009): 301-310.
- 9 Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y. & Gao G. F. "Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N1" *Trends Microbiol* 22, (2014):183–191.
- 10 Spackman, E. "Avian influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR" *J. Methods Mol Biol.* Vol. 1161 (2014): 105-108.
- 11 Webster, R.G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. & Kawaoka Y. "Evolution and ecology of influenza A viruses" *Curr Top Microbiol Immunol* 56 (1992): 152–179.
- 12 Fouchier, R.A. "Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene" *J Clin Microbiol.* Vol.38 (2000): 4096-4101.
- 13 Lupiani, B. and Reddy, S.M. Lamont S J, H Zhou "RNA-seq Analysis Revealed Novel Genes and Signaling Pathway Associated With Disease Resistance to Avian Influenza Virus Infection in Chickens" (2013): 03557. 2015.
- 14 Spackman, E, Senne, D.A., Myers, TJ, Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., 629 Lohman, K., Daum, L.T., Suarez D.L. "Development of a real-time 630 reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the 631 avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes" *J Clin Microbiol* 40 (2002): 632 3256–3260.
- 15 Xie, Z., Xie, L., Zhou, C., Liu, J., Pang, Y., Deng, X., Xie, Z., Fan Q. "Complete genome sequence analysis of an H6N1 avian influenza virus isolated from Guangxi pockmark ducks". *J. Virol.*86 (2012)::13868–13869.
- 16 WHO Manual 011 "Animal Influenza Diagnosis and Surveillance R.Webster, N. Cox, K. Stohr – Global Influenza Programmer" World Health Organization, Switzerland. (2010): 99.
- 17 Xie, Z., Guo, J., Xie, L., Liu, J., Pang, Y., Deng, X., Xie, Z., Fan, Q., Luo S. 2013 "Complete genome sequence of a Novel reassortant Avian Influenza H1N2 virus isolated from a domestic sparrow in 2012" *J. Genome Announc.* 1(4):e00431-13. 10.1128/genomeA.00431-13. 1128/JVI.02700-12.
- 18 Wright, S.M., Kawaoka, Y., Sharp G.B. e.a. "Interspecies transmission and reassortment of influenza A viruses in pigs and turkeys in United States" *Am J Epidemiol.* Vol. 136 (1992): – P. 448-97.
- 19 Hiromoto, Y., Yamazaki, Y., Fukushima T. e.a."Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus" *J Gen Virol.* Vol.81 (2000): 1293-1303.
- 20 Sklyarenko, S. L. "Research on Important Bird Areas in Kazakhstan and Middle Asia" *Almaty,* (2016): – 227.
- 21 Webster, R.G., Yakhno, M., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Murti K.G.. "Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks" *Virology* Vol. 84 (1978): 268-276.
- 22 Bakulin, V.A. Flu bird. "Mazhdunarodnaya spetsializirovannaya kongress vystavka [International Specialized Congress Exhibition St. Petersburg]" *Web Sources: "Veterinary Medicine, Livestock."* Issue 1 (2005): 4.
- 23 Danchinova, G. A., Lyapunov, A.V., Khasnatinov, M. A. "Raznoobraziye i rasprostraneniye virusov grippa A sredi ptits v vostochnoy Sibiri [Diversity and distribution of influenza A viruses among birds in Eastern Siberia]" *Experimental research in biology and medicine.* No. 5 (2015): 105.
- 24 Sharshov, K. A., Li Xin Xin, Yurlov, A. K., Shestopalov A. M. "Ekologicheskoye raznoobraziye dikikh ptits – yestestvennogo rezervuara virusa grippa A na yuge zapadnoy Sibiri [Ecological diversity of wild birds – a natural reservoir of influenza A virus in the South of Western Siberia]" *Journal Articles: "South of Russia: ecology, development",* Vol. 12, No. 44 (2016): 56-66.
- 25 Sultankulova, K.T., Akylbayeva, K.K., Kozhabergenov, N.S., Kydyrbaev, Zh.K., Orynbayev M.B. "Vyyavleniye virusa grippa A/N5 u dikikh ptits [Detection of the A / H5 influenza virus in wild birds]" *Journal Articles: Bulletin of Shakarim State University of Semey.* 2 (2019) 296-299.
- 26 Kumar, S., Stecher, G., and Tamura K. "Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets" *Molecular Biology and Evolution* 33 *MEGA7* (2016): 1870-1874.
- 27 Kamps, B.S., Hoffmann, C., Preiser, B.S., Kamps, C., Hoffmann W., Preiser W. "Influenza Report" *Flying Publisher,* (2006).
- 28 Alexander, D.J. "An overview of the epidemiology of avian influenza" *Vaccine* Vol. 25,30 (2007): 5637-5644.
- 29 Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenström, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G.F., Beyer, W.E., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A.D., Fouchier R.A. "Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds]" *PLoS.* Vol 3(5) (2007): 61.
- 30 Prosser, D.J., Cui, P., Takekawa, J.Y., Tang M., Hou Y., Collins B.M., Yan, B., Hill N.J., Li T., Li Y., Lei F., Guo S., Xing Z., He Y., Zhou Y., Douglas D.C., Perry W.M., Newman S.H. "Wild bird migration across the Qinghai-Tibetan plateau: a transmission route for highly pathogenic H5N1" *PLoS. One.* Vol. 6 (2011): e17622.
- 31 Webster, R.G. "The importance of animal influenza for human disease" *J. Vac* Vol. 20, No. 2 (2002): 16-20.