

В.Ю. Марченко, К.А. Шаршов, А.М. Шестопалов**ЭКОЛОГИЯ ВИРУСА ГРИППА В ПОПУЛЯЦИЯХ ДИКИХ ПТИЦ ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ****Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область)**

Представлены результаты мониторинга вируса гриппа А среди диких птиц Центральной Азии в 2003–2009 гг. Было исследовано 2604 образца от диких птиц. На территории Казахстана было собрано 279 проб от диких птиц, 650 образцов было собрано на территории Монголии и 1675 на территории России. Выделение вируса было показано из проб, собранных в Монголии (13 изолятов) и России (4 изолята). В результате вирусологического анализа было показано, что 6 изолятов относятся к H3N6-субтипам вируса гриппа, 5 к H4N6. Также было выделено 2 вируса гриппа H1N1 субтипа, H10N7, H3N8 и новый для Центральной Азии H13N8 субтип вируса гриппа А.

Ключевые слова: Вирус гриппа А, Центральная Азия, дикие птицы

ECOLOGY OF INFLUENZA VIRUS IN WILD BIRD POPULATIONS IN CENTRAL ASIA**V.Yu. Marchenko, K.A. Sharshov, A.M. Shestopalov****Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo**

The study provides the results of AIV surveillance in Central Asia region during 2003–2009. We have analyzed 2604 samples from wild birds. These samples were collected in Kazakhstan (279), Mongolia (650), and Russia (1675). Isolated viruses from samples collected in Mongolia (13 isolates) and in Russia (4 isolates) were described. Virological analysis has shown that 6 isolates belong to H3N6 subtype and 5 isolates belong to H4N6 subtype. Two H1N1 influenza viruses, one H10N7 virus, two H3N8 viruses, and H13N8 virus, which is new for Central Asia, have been also isolated. Samples were taken from birds of 6 orders, including several species, preferring water and semi-aquatic biotopes, one species, preferring dry plain regions, and one more species which can inhabit both dry and water biotopes.

Key words: influenza A virus, Central Asia, wild birds

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа А типа (Orthomyxoviridae, Orthomyxovirus) выделяются от различных видов птиц и млекопитающих, включая человека [8]. К настоящему моменту циркуляция вирусов гриппа А со всеми известными подтипами гематоглиотинина и нейраминидазы зарегистрирована только среди птиц [7, 8]. Миграции диких птиц способствуют географическому распространению различных вариантов вирусов [1]. Изучение циркуляции вирусов гриппа среди диких птиц в регионах, расположенных на путях миграций птиц, является необходимым элементом для оптимизации мероприятий по контролю над распространением возбудителя. Важным регионом для контроля и изучения распространения вируса гриппа птицами во время миграции в Евразии является Центральная Азия, особенно юг Красноярского края (Россия) и территория западной части Монголии, а именно, Котловина Больших Озер, являющаяся средой обитания и гнездования большого видового разнообразия птиц.

Физико-географические характеристики и структура орнитофауны определяют важность Центральной Азии в экологии вируса гриппа А. Через данный регион проходят основные миграционные маршруты диких птиц между Китаем, странами Юго-восточной Азии и Россией, объединяющая огромные популяции птиц различных видов в Центрально-Азиатский пролетный путь [3, 4]. По результатам недавних исследований, современная

орнитофауна Центральной Азии включает в себя 383 вида птиц, относящихся к 20 отрядам. На долю птиц водно-болотного комплекса, которые являются природным резервуаром вируса гриппа А, приходится более 30 %. Во время сезонных миграций на озерах Центральной Азии наблюдается высокая концентрация различных видов диких птиц. Это объясняется небольшим количеством подходящих для гнездования водоемов. Высокая концентрация птиц может являться благоприятным условием для передачи вируса гриппа между различными видами, что в свою очередь может привести к реассортации геномов различных штаммов вируса гриппа А и появлению в природе новых субтипов..

Следует также отметить, что подобные исследования на данной территории немногочисленны [5]. Имеющихся данных недостаточно, чтобы однозначно делать заключения о закономерностях эволюции и экологических особенностях вируса гриппа на территории Центральной Азии.

В связи с этим, настоящая работа посвящена изучению современного разнообразия циркулирующих в Центральной Азии вариантов вируса гриппа типа А, а также определению таксономической и экологической гетерогенности видов диких птиц, поддерживающих эту циркуляцию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В нашем исследовании мониторинг ВГА систематически проводился на территории западной части республики Монголия, республики Казахстан

и юга Центральной Сибири (Красноярский край, республика Хакасия) в России. Места проведения мониторинговых работ определялись в соответствии с данными о миграциях птиц таким образом, что точки сбора материала лежали в пределах миграционных маршрутов диких птиц, летящих Центрально-Азиатским пролетным путем. Сбор биологического материала проводили, в основном, в осенний период, на территориях крупных озер в местах наибольшего скопления дикой птицы. На территории Монголии сбор материала проводили на озерах Убсу-Нур, Ачит-Нур, Хар-ус-нур, на территории Казахстана – на озере Алаколь, на территории России – на озере Убсу-нур, а также на небольших озерах республики Хакасия и на юге Красноярского края. Птицы добывались отстрелом, а также при помощи орнитологических паутинных сетей (мелкие воробьинообразные и кулики).

Биологический материал представлял собой клоакальные смывы и фрагменты кишечника. Клоакальные смывы помещались в 2мл пробирки, содержащие транспортную среду, содержащие стерильный фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH = 7,2), стерильный глицерин в соотношении объемов 1:1 и антибиотики: пенициллин, стрептомицин, гентамицин и нистатин в концентрациях 2 × 10⁶ ед/л, 0,20 г/л, 0,25 г и 0,5 × 10⁶ ед/л соответственно [10].

Изоляцию вируса проводили путем инокуляции клоакальных смывов или гомогенатов органов в аллантоисную полость девятидневных развивающихся куриных эмбрионов согласно рекомендациям ВОЗ [10].

Идентификацию изолятов проводили в реакции торможения гемагглютинации с использованием набора диагностических референс антител (WHO, 2002; Reference antisera and antigens to the HA of influenza A and B viruses), любезно предоставленную доктором Вэбстером (Мэмфис, США), а также с помощью ПЦР с использованием субтипизирующих праймеров [ссылка].

ПЦР амплификация и сиквенс. Вирусная РНК была выделена из аллантоисной жидкости с помощью набора SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, USA). Для обратной транскрипции были использованы универсальные праймеры Uni12 и AMV-reverse Transcriptase (Fermentas, Lithuania). Для ПЦР были использованы праймеры, специфичные к каждому гену [11]. Ампликоны выделяли с помощью набора QIAquick gel extraction kit (Qiagen, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате мониторинга вируса гриппа среди диких птиц Центральной Азии было собрано и обследовано 2604 проб биологического материала от птиц (табл. 1). На территории Казахстана было собрано 279 проб от диких птиц, 650 образцов было собрано на территории Монголии и 1675 на территории России.

В общей сложности, 102 вида диких птиц, относящихся к 14 отрядам, было проверено на носитель-

ство вируса гриппа. Основное количество особей составили птицы трех отрядов – Гусеобразные (Anseriformes), Ржанкообразные (Charadriiformes) и Воробьинообразные (Passeriformes). Процентное соотношение количества особей птиц данных отрядов было примерно одинаковым и составило, от общего числа, 23,2, 26,3, 25,9 % соответственно. 11,5 % птиц принадлежали к отряду Аистообразные (Ciconiiformes). На долю остальных 10 отрядов птиц пришлось около 13 %.

Из обследованного материала было выделено 17 штаммов вируса гриппа (табл. 2). Результаты исследований показывают, что основную роль в циркуляции вируса гриппа птиц на территории Центральной Азии играют дикие водно-болотные птицы. В нашем исследовании к ним относятся птицы, относящиеся к семействам Anatidae, Laridae, Podicipedidae and Phalacrocoracidae. От птиц данной группы было выделено 14 штаммов ВГА, что составило 82,4 % от всех выделенных в данной работе изолятов. Для представителей водно-болотных птиц, относящихся к отряду гусеобразные (хохлая чернеть, черный турпан, большой крохаль, кряква, огарь, красноголовый нырок, чирок-свистунок и широконоска) в данной работе выделение вируса составило 53 % и 29,4 % для отрядов ржанкообразные (серебристая чайка), поганкообразные (чомга) и пеликанообразные (большой баклан).

Виды птиц, от которых нами был выделен вирус гриппа, являются мигрирующими на значительные расстояния Евразии. Так, например, красноголовый нырок мигрирует в прибрежные области Средиземного и Черного морей, Восточную Африку, на побережье Каспия, Иран и Индию. Восточные популяции мигрируют на восток и юго-восток, достигая территорий Юго-Восточной Азии, Японских островов [9]. Область гнездования различных популяций чирка-свистунка очень обширна, захватывает почти всю Западную Европу и большую часть Средней Азии на юге до северной части Ирана, Северо-Западной Монголии и Маньчжурии включает северную половину Японии и западную часть Северной Америки до Великих озер. Зимует чирок-свистунок в Западной Европе, Средиземноморье, на юге Азии [2].

Из мировой литературы известно, что штаммы вируса гриппа А выделены более чем от 105 видов, принадлежащих к 12-ти из 50-ти отрядов птиц [5, 8], хотя доля каждого отряда и вида птиц в поддержании циркуляции вируса гриппа А пока не достаточно определена. Однако среди различных экологических групп птиц была выявлена гетерогенность в распределении субтипов вируса гриппа. Хотя наибольшее количество и разнообразие вируса гриппа изолируется от водоплавающих птиц, было замечено, что например штаммы вируса гриппа H13 подтипа чаще всего встречаются среди птиц береговой линии и чаек [2, 6, 9].

Наши исследования подтвердили этот факт. Так от серебристой чайки (*Larus argentatus*), пойманной на территории озера Убсу-нур, был выделен изолят вируса гриппа А субтипа H13N8 – штамм А/

Таблица 1

Таксономическая и количественная характеристики диких птиц Центральной Азии

Отряд	Семейство	Количество видов	Количество особей	Количество положительных проб
Гусеобразные	утиные	17	604	9
Ржанкообразные	бекасовые	14	684	1
	чайковые	4		
	ржанковые	3		
	крачковые	1		
	шилоклювковые	1		
Воробьинообразные	врановые	6	674	2
	мухоловковые	6		
	трясогузковые	5		
	овсянковые	4		
	жаворонковые	3		
	воробьиные	2		
	славковые	2		
	вьюрковые	2		
	дроздовые	2		
	сорокопутовые	1		
	скворцовые	1		
	ласточковые	1		
	суторовые	1		
Аистообразные	цаплевые	2	300	
	ибисовые	1		
Журавлеобразные	пастушковые	2	118	
	настоящие журавли	1		
Поганкообразные	поганковые	2	45	1
Пеликанообразные	баклановые	1	95	3
Хищные птицы	ястребиные	6	42	1
	соколиные	1		
Курообразные	фазановые	3	16	
Голубеобразные	голубиные	3	18	
Ракшеобразные	удодовые	1	3	
Кукушкообразные	кукушковые	1	2	
Дятлообразные	дятловые	1	2	
Совообразные	совиные	1	1	
Всего: 14	33	102	2604	17

herring gull/Mongolia/454/08 (GenBank: JF775470-JF775477).

Результаты проведенных исследований показали, на территории Центральной Азии активно циркулируют вирусы гриппы у диких птиц различных видов. Наличие большого количества озер и разнообразие орнитофауны на них играет важную роль в поддержание циркуляции вируса гриппа птиц на данной территории и в распространении по всему континенту.

Проведенные исследования показали, что в поддержание циркуляции вируса гриппа в обследо-

ванном регионе вовлечены различные виды диких птиц. В основном, это птицы отряда гусеобразные (хохлатая чернеть, черный турпан, большой крохаль, кряква, огарь, красноголовый нырок, чирок-свистунок и широконоска), что подтверждает их ключевую роль в распространении вируса как основных хозяев. Отмечено носительство гриппа у хищных птиц (Лунь болотный) и видов, экологически не связанных с водоемами (сорока, каменка плясунья). Что касается последних, то вовлеченность данных видов в эпизоотический процесс мало описана и, скорее, носит случайный характер. В

литературе описан ряд случаев выделения вируса гриппа от представителей отрядов соколообразные и воробьинообразные. От птиц данных отрядов выделяли как низкопатогенные варианты, так и высокопатогенные вирусы гриппа H5N1 субтипа. Однако так и не описано дальнейшего распространения вирусов гриппа данными видами птиц. В связи с этим, можно предположить, что данные виды, скорее всего, являются эволюционным тупиком в распространении вируса гриппа.

Тем не менее, широкий круг видов птиц, поддерживающих циркуляцию вируса гриппа, позволяет ему существовать и эффективно распространяться среди отрядов и видов восприимчивых хозяев. Это является весьма благоприятным условием для реассортации геномов различных штаммов вируса гриппа А, что, в свою очередь, ведет к увеличению гетерогенности вирусной популяции и обеспечивает формирование большего разнообразия вирусов. Так, например, от серебристой чайки нами был выделен уникальный для Центральной Азии штамм вируса гриппа H13N8 субтипа. В литературе до сих пор нет данных о выделении данного субтипа вируса гриппа в исследуемом регионе. Следует отметить, что для штаммов H13 субтипа гемагглютинаина характерна экологическая связь с различными видами чаек. Подобная ситуация показана и в нашем исследовании. Несмотря на то, что в генофонде ВГА сравнительно редко регистрируются новые комбинации, нам удалось впервые выделить новый для территории Азии субтип вируса гриппа.

Ранее показано, что вирус гриппа птиц H3N8 и H3N6 субтипов, подобный выделенным в нашей

работе вариантам, широко распространен среди популяций диких птиц Евразии и Америки. Подавляющее большинство видов-хозяев данных субтипов принадлежит отряду гусеобразные [8]. Полученные нами результаты дополняют современную картину распространения этих субтипов в Центральной Азии. Следует отметить, что, по данным литературы, среди вируса гриппа H3-субтипа гемагглютинаина не было выявлено высокопатогенных для птиц вариантов. Однако описаны варианты H3N8, которые адаптированы к млекопитающим. В частности, некоторые из них вызывают эпизоотии гриппа лошадей с последующей передачей собакам.

Вирус гриппа H10-субтипа гемагглютинаина распространен в меньшей степени. Ранее он был выделен на Североамериканском континенте, в Германии, Иране, Египте, Корее, Японии (данные GenBank). Наши исследования подтверждают присутствие этого субтипа в популяциях птиц, обитающих в Центральной Азии. На примере вируса гриппа H10N7 была показана острая необходимость ветеринарного контроля сельскохозяйственной продукции. Вирус этого субтипа был изолирован из мяса птицы, ввезенной контрабандой из Китая в Италию. При этом данный штамм содержал нуклеотидные последовательности генов PB2 and NS, имеющие высокую гомологию таковым у высокопатогенного штамма A/duck/Zhejiang/52/2000 (H5N1).

В целом, вирусывыделение составило менее одного процента. Подобный низкий процент выделения вируса гриппа, в сравнении со значением 5–15 % по литературным данным, мы объясняем физико-географическими характеристиками данного региона и экологическими особенностями

Таблица 2

Субтипы вируса гриппа А, выделенные от диких птиц

Штамм	Субтип	Год и место выделения	Объект выделения
A/magpie/Mongolia/17/03	H4N6	Август 2003, Монголия	Сорока
A/isabelline wheater/Mongolia/19/03	H4N6	Август 2003, Монголия	Каменка плясунья
A/grebe/Mongolia/24/03	H4N6	Август 2003, Монголия	Чомга
A/cormorant/Mongolia/5/03	H4N6	Август 2003, Монголия	Баклан большой
A/cormorant/Mongolia/2/03	H4N6	Август 2003, Монголия	Баклан большой
A/cormorant/Mongolia/22/04	H3N6	Август 2004, Монголия	Баклан большой
A/tufted duck/Mongolia/16/04	H3N6	Август 2004, Монголия	Хохлатая чернеть
A/velvet scoter/Mongolia/19/04	H3N6	Август 2004, Монголия	Черный турпан
A/common merganser/Mongolia/29/04	H3N6	Август 2004, Монголия	Большой крохаль
A/marsh harrier/Mongolia/30/04	H3N6	Август 2004, Монголия	Лушь болотный
A/Mallard/Mongolia/2307/2006	H1N1	Сентябрь 2006, Монголия	Кряква
A/roody shelduck/Mongolia/632/2007	H1N1	Сентябрь 2007, Монголия	Огарь
A/herring gull/Mongolia/454/08	H13N8	Сентябрь 2008, Монголия	Серебристая чайка
A/pochard/Siberia/249/08	H10N7	Август 2008, Республика Хакасия	Красноголовый нырок
A/european teal/Siberia/237/08	H3N8	Август 2008, Красноярский край	Чирок-свиистунок
A/shoveler/Siberia/236/08	H3N6	Август 2008, Красноярский край	Широконоска
A/mallard/Siberia/294/08	H3N8	Август 2008, Красноярский край	Кряква

авиафауны. И мы считаем, что особенности экологических связей хозяев вируса гриппа приводят к более низкому, чем в других регионах, проценту носительства вируса гриппа в популяциях диких птиц.

С другой стороны, несмотря на низкий процент выделения, показано достаточно большое разнообразие субтипов вируса гриппа (табл. 2), включая выделение нового для Центральной Азии субтипа H13N8, а также участие в циркуляции вируса среди видов хозяев различных таксономических и экологических групп. Высокпатогенного вируса гриппа типа А субтипа H5N1 в наших исследованиях не выявлено. Однако следует отметить, что с 2006 г. на территории республики Тыва (Россия) регулярно фиксировались вспышки среди диких птиц, вызванные высокпатогенным вирусом гриппа H5N1 субтипа. Хронология возникновения вспышек в Центральноазиатском регионе может свидетельствовать о том, что территория Центральной Азии является ключевым регионом в эпизоотологии вируса гриппа.

Таким образом, исследования, проведенные по изучению циркуляции вируса гриппа у диких птиц, обитающих или мигрирующих в Центральной Азии, подтверждают важность этой территории в распространении вируса гриппа птиц для всей Евразии и подчеркивает необходимость мониторинговых исследований в этом регионе.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 12.741.12.0153, № 16.740.11.0179, № 02.740.11.0709, № 11.519.11.2014) и грантом по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

Сведения об авторах

Марченко Василий Юрьевич – научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» (630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»; тел./факс: (383)336-75-40; e-mail: marchenko_vyu@vector.nsc.ru)
Шаршов Кирилл Александрович – к.б.н., заведующий лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»
Шестопалов Александр Михайлович – д.б.н., заведующий отделом ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д.К., Ильичев В.Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекции. – М., 1979. – 270 с.
2. Мониторинг за циркуляцией вирусов гриппа А в популяциях диких птиц Северного Каспия / С.С. Ямникова [и др.] // Вопр. вирусол. – 2001. – № 4. – С. 39–43.
3. Национальный атлас МНР. – Улан-Батор, М: Изд-во АН МНР и АН СССР 1990. – 144 с.
4. Рябицев В.К. Птицы Урала, Приуралья и Западной Сибири: Справочник-определитель. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2002. – 608 с.
5. Экология и эволюция вирусов гриппа в России (1979–2002 гг.) / Д.К. Львов [и др.] // Вопр. вирусол. – 2004. – № 3. – С. 17–24.
6. Alexander D.J. A review of avian influenza in different bird species // Vet. Microbiol. – 2000. – Vol. 74. – P. 3–13.
7. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls / R.A. Fouchier [et al.] // J. Virol. – 2005. – Vol. 79 (5). – P. 2814–2822.
8. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G. Webster [et al.] // Microbiol. Rev. – 1992. – Vol. 56. – P. 152–179.
9. Horimoto T., Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses // Clin. Microbiol. Rev. – 2001. – Vol. 14. – P. 129–149.
10. The National Training Course on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. – Harbin, 2001. – 79 p.
11. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses / E. Hoffmann [et al.] // Arch. Virol. – 2001. – Vol. 146. – P. 2275–2289.