

ИЗУЧЕНИЕ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ УБСУНУРСКОГО МИГРАЦИОННОГО ОЧАГА РЕСПУБЛИКИ ТЫВА

М.С. Волков¹, А.В. Варкентин², В.Н. Ирза³, И.А. Чвала⁴, А.Э. Меньщикова⁵,
А.В. Андриясов⁶, М.А. Циванюк⁷, Ч.Б.-О. Оюн⁸, С.В. Роголев⁹, М.Ш.-О. Арапчор¹⁰

¹ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: volkov_ms@arriah.ru

² научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: varkentin@arriah.ru

³ главный эксперт ИАЦ, доктор ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: irza@arriah.ru

⁴ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chvala@arriah.ru

⁵ руководитель сектора, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: menschikova@arriah.ru

⁶ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: andriyasov_av@arriah.ru

⁷ научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: tsivanuk@arriah.ru

⁸ заместитель начальника отдела внутреннего ветеринарного надзора территориального управления РСХН по Республикам Хакасия и Тыва, e-mail: tuvshn_ozg@mail.ru

⁹ инспектор территориального управления РСХН по Республикам Хакасия и Тыва, e-mail: tuvshn_ozg@mail.ru

¹⁰ заместитель руководителя территориального управления РСХН по Республикам Хакасия и Тыва, e-mail: rsnkhakasia@mail.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты многолетних мониторинговых исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» российской части акватории озера Убсу-Нур Республики Тыва на предмет выявления циркуляции вируса гриппа типа А в популяциях диких перелетных птиц. Определена экологическая и биологическая значимость прибрежной территории озера в организации эпидемиологических исследований. Установлена циркуляция вируса высокопатогенного гриппа птиц в популяциях дикой орнитофауны на территории убсунурского миграционного очага.

Ключевые слова: грипп птиц, ньюкаслская болезнь, дикая перелетная птица, озеро, эпизоотия, вспышка, природный очаг, миграция.

ВВЕДЕНИЕ

Соленое бессточное озеро Убсу-Нур находится в тектонической впадине — северо-восточной части Котловины Больших озер, которая насчитывает большое количество пресноводных и соленых водоемов. Российский сектор озера расположен на юге Республики Тыва с протяженностью береговой линии около

10 км. Климат котловины является резко континентальным с существенными колебаниями суточных и годовых температур.

Объект исследования выбран не случайно, хозяйственная деятельность человека в исследуемом районе ограничивается пастбищным скотоводством, а слабое антропогенное воздействие на экосистему и фаунистический комплекс котловины определили разнообразие орнитофауны, которая представлена здесь 376 видами птиц, из которых 308 — гнездящиеся. Наибольшая часть пролетных видов представлена отрядами ржанкообразных, гусеобразных и воробьеобразных, которые при миграции по Центрально-Азиатскому пролетному пути останавливаются на озерах котловины. Водоемы Убсунурской котловины в летний период представляют места концентрации огромного количества водоплавающих и околоводных птиц с максимальной площадью заселения прибрежных зон озера Убсу-Нур ввиду наличия обширных тростниковых зарослей и высокой кормности озера [4]. «Необитаемость» прибрежной части озера, заболоченные берега с обширными тростниковыми зарослями, кормовая база (алтайский осман) привлекают диких перелетных



птиц и определяют постоянные места гнездования пернатых.

Необходимо отметить, что большое количество гнездящихся и залетных видов птиц Убсунурского биотопа занесено в Красную книгу Российской Федерации [4]. Данный факт ограничивает возможность проведения активного мониторинга на территории озера, однако губительные эпизоотии высокопатогенного гриппа не щадят ни классические, ни редкие, ни реликтовые виды птиц и разрушают устойчивую орнитофаунистическую систему котловины [5]. Примером данного утверждения могут служить результаты наблюдения доктора А.П. Савченко, по данным которого в 2006 г. на озере преимущественным видом погибших птиц стала чомга (*Podiceps cristatus*), плотность гнездования которой

достигала 2,0 тыс. пар на 1 км². Массовый падеж и распространение инфекции на другие виды совпали со временем достижения большей части птенцов чомги 12–14-суточного возраста. Савченко А.П. указывает на ощутимые экологические последствия эпизоотии гриппа в популяции диких птиц озера Убсу-Нур, только с 2008 по 2009 гг. произошло резкое сокращение их обилия (от 3,5 до 10 крат). При этом ученый отмечает, что на большинстве водоемов юга Центральной Сибири исчезла лысуха, резко уменьшились популяции красноглазого черныша и чирка-трескунка [5].

Учитывая сложную эпизоотическую и эпидемиологическую ситуацию в мире, разнообразие подтипов вируса гриппа А, выделяемых от разных видов диких птиц, проведение комплексного активного и пассивного мониторинга в популяциях диких водоплавающих птиц является актуальной и важной задачей практи-

Колонии водоплавающих птиц над местами гнездований (май, 2015)





Обмеление озера Убсу-Нур (май, 2015)

ческой ветеринарной, биологической и медицинской наук, которая направлена на сохранение здоровья человека и стабилизацию социально-экономических последствий в результате вспышек заболевания.

Целью данной работы явился анализ результатов многолетних мониторинговых исследований российской части акватории озера Убсу-Нур Республики Тыва на предмет выявления циркуляции вируса гриппа типа А в популяциях диких перелетных птиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспедиции в Республику Тыва на озеро Убсу-Нур организованы в соответствии с планом реализации государственного мониторинга. В качестве биологического и патологического материала отбирали пробы помета (пуловые пробы), участок кишечника и мозга от мертвых птиц, кровь для последующего получения сыворотки [1]. При отборе образцов для исследований проводили идентификацию вида с использованием определителей видов птиц [6, 7]. Доставку материала в лабораторию осуществляли в герметичных влагонепроницаемых термоконтейнерах с наличием аккумуляторов холода в соответствии с действующими нормами. Лабораторные исследования проводили в соответствии с «Ветеринарными правилами лабораторной диагностики гриппа А птиц» и Рекомендациями по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных МЭБ [1, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В июне 2006 г. на озере Убсу-Нур Овюрского района Республики Тыва Российской Федерации была зарегистрирована массовая гибель дикой водоплавающей птицы. Общее количество мертвых птиц составило 3749 голов, преобладающим видом была чомга (*Podiceps cristatus*). Результаты вирусологических и молекулярно-биологических исследований показали, что

причиной массового падежа стал вирус высокопатогенного гриппа птиц типа А подтипа H5N1.

Во второй половине июня 2009 г. в прибрежной части российской территории озера было обнаружено 58 голов мертвых птиц следующего видового состава: чомга (*Podiceps cristatus*), гусь гуменник (*Anser fabalis*), колпица (*Platalea leucorodia*), черноголовый хохотун (*Larus ichthyaetus*). Превалирующим видом птиц, у которых генетический материал вируса гриппа H5N1 был выделен в большинстве проб, стала чомга.

В июне 2010 г. на озере случай массовой гибели диких водоплавающих птиц повторился — пало 367 голов, причина — высокопатогенный грипп типа А подтип H5N1. Видовой состав представителей орнитофауны: чомга (*Podiceps cristatus*), крохаль (*Mergus merganser*), серая цапля (*Ardea cinerea*), колпица (*Platalea leucorodia*), серая утка (*Anas strepera*), баклан (*Phalacrocorax carbo*), лысуха (*Fulica atra*), белая цапля (*Egretta alba*), красноголовый нырок (*Aythya ferina*).

По данным доктора М.Ю. Щелканова, вспышка гриппа в популяции диких птиц озера в 2009 г. была этиологически связана с вирусом высокопатогенного гриппа птиц H5N1 уссурийского генотипа — 2.3.2 (Приморский край). Проникновение инфекционного начала произошло из Юго-Восточной Азии вдоль Джунгарского миграционного русла. Однако «убсунурский» вирус 2006 г. имел иное происхождение. Так, молекулярно-генетический анализ показал близость возбудителя с индо-пакистанскими штаммами и дистантность от цинхайских изолятов, на основании чего следует полагать, что занос вируса на озеро Убсу-Нур первоначально произошел с полуострова Индостан вдоль восточного ответвления Индо-Азиатского миграционного русла [8].

Следует подчеркнуть, что прослеживается строгая сезонность периодов массовой гибели птиц на озере Убсу-Нур, все случаи произошли в июне месяце.

Несмотря на то, что в 2011 и 2012 гг. на территории озера случаев гибели птиц зарегистрировано не было,

специалистами ФГБУ «ВНИИЗЖ» совместно с сотрудниками регионального Россельхознадзора ежегодно проводились активные мониторинговые исследования в прибрежных районах озера Убсу-Нур в связи с ранее неблагоприятной эпизоотической обстановкой по высокопатогенному гриппу птиц. В 2011 г. было исследовано 243 пробы сывороток крови и 112 проб патологического материала от диких и синантропных птиц. В результате исследований в 2 пробах сывороток крови от чомги (*Podiceps cristatus*) в РТГА выявлены специфические антитела к вирусу гриппа птиц подтипа H5 в диагностически значимых титрах (4,0–5,0 log₂). Кроме того, в 11 пробах от диких птиц определены антитела в титрах 2,0–3,0 log₂ к вирусу подтипов H5 и H7. Антитела на уровне ниже диагностического титра были выявлены в сыворотках крови от коршуна (*Milvus migrans*) (H5/H7), чомги (*Podiceps cristatus*) (H7), серой утки (*Anas strepera*) (H7), чайки озерной (*Larus ridibundus*) (H7) и большого баклана (*Phalacrocorax carbo*) (H7).

В 2012 г. при исследовании 124 проб сывороток крови и 79 проб образцов патологического материала от домашних, диких и синантропных птиц, отобранных на территории Республики Тыва, генетического материала и специфических антител к вирусу гриппа птиц подтипов H5 и H7 не обнаружено.

При мониторинговых исследованиях 2013 г. в сыворотках крови диких птиц (чайка, баклан, серая утка) выявлены антигемагглютинины к вирусу гриппа подтипа H5.

В 2014 г. при исследовании в РТГА 50 проб сывороток крови от диких водоплавающих птиц выявлено 24 положительных результата. Специфические антигемагглютинины к H5 обнаружены в 1 пробе (малая чайка), к подтипу H7 — в 16 пробах (малая чайка, черноголовый хохотун, баклан) и к подтипу H9 — в 10 пробах (малая чайка, черноголовый хохотун). Факт выявления

специфических антител у диких птиц свидетельствует о циркуляции вируса гриппа подтипов H5, H7 и H9 в их популяции и представляет реальную угрозу для промышленного птицеводства Российской Федерации и экологической стабильности биотопа. Из 24 проб биологического материала была выделена РНК вируса гриппа типа А, однако при постановке ОТ-ПЦР-РВ с праймерами на ген H5, H7 и H9 видовая специфичность к данным подтипам была исключена. В одной пробе от дикой утки-широконоски методом ОТ-ПЦР-РВ был идентифицирован подтип H3.

В конце мая 2015 г. специалисты ФГБУ «ВНИИЗЖ» совместно с государственными инспекторами территориальных управлений Россельхознадзора по Республикам Хакасия и Тыва в сопровождении сотрудников Росприроднадзора провели обследование акватории российской стороны озера Убсу-Нур и активный мониторинг популяции диких птиц на предмет вирусносительства возбудителей особо опасных болезней (грипп птиц, ньюкаслская болезнь). На побережье озера найдены мертвыми 2 головы большой поганки и 2 крачки. В результате вирусологических исследований от павших птиц был выделен вирус гриппа А/H5N1. При проведении сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Н длиной 258 н. было установлено, что исследуемые изоляты принадлежат к азиатской генетической линии вируса высокопатогенного гриппа птиц (линия A/Guandong/1/96, клада 2.3.2.1). По фрагменту гена Н к выявленным изолятам наиболее близкими оказались последовательности вирусов гриппа А птиц подтипа H5N1, выделенных в Алтайском крае в 2014 г. (99,61–99,22% совпадений) и Астраханской области в 2015 г. (98,44–98,04% совпадений), а также последовательности изолятов вируса гриппа А птиц подтипа H5N1, выделенных в Китае, Индонезии и Вьетнаме в 2012–2014 гг. (98,83–98,04% совпадений).

В 3 образцах сывороток крови от диких птиц выявлены антитела к возбудителю ньюкаслской болезни

Кулики на отмели (май, 2015)





Затопленное гнездо ржанкообразных (май, 2015)

в диагностически значимых титрах (баклан — $6,0 \log_2$, лысуха — $3,0 \log_2$, баклан — $3,0 \log_2$).

Настораживает факт уменьшения площади зеркала озера в связи с его высыханием (по данным 3 лет), что может сказаться на «пластичности» орнитокомплекса озера.

Отсутствие случаев регистрации гибели птиц в период 2007–2008 гг. не может служить основанием для суждения об отсутствии циркуляции разных подтипов вируса гриппа в популяции дикой авифауны.

Основным видом птиц, пострадавшим от эпизоотий высокопатогенного гриппа на озере, была чомга (большая поганка, *Podiceps cristatus*).

Учитывая тенденцию к обмелению озера и свойственную птицам колониальность, увеличение плотности диких перелетных птиц на ограниченной и с каждым годом уменьшающейся территории может привести к развитию широкой эпизоотии и гибели популяции редких и реликтовых видов птиц.

До сих пор остается дискуссионным вопрос о природной очаговости гриппа птиц. Многие авторы относят грипп к природно-очаговому нетрансмиссивным заболеваниям. Является ли прибрежная часть территории озера Убсу-Нур, где гнездится колоссальное количество диких птиц, представляющих резервуар инфекции, природным очагом заболевания? Учитывая тот факт, что природная очаговость свойственна не только трансмиссивным заболеваниям, дискуссия о природе гриппа является актуальным вопросом. Для ответа на него необходимо четко определить критерии природной очаговости и сопоставить с ними эпидемиологические характеристики гриппа в популяции диких птиц озера. Характерными для природного очага элементами являются природный резервуар возбудителя, сезонность заболевания и территориальность (географический ландшафт). В соответствии с данными критериями на территории озера Убсу-Нур поддерживается природный очаг высокопатогенного гриппа

H5N1: дикие птицы водного и околоводного комплекса являются природным резервуаром возбудителя, где поддерживается его циркуляция и обеспечивается существование вируса как биологического вида; выполняется и условие сезонности заболевания, так как места гнездования и зимовок для мигрирующих видов птиц не совпадают, что не противостоит концепции «подвижности (плавучести)» природных очагов; территория предполагаемого природного очага определена гнездовым ареалом диких перелетных птиц и мест кормежек [2]. Природно-климатические условия Убсунурской котловины являются оптимальными для обеспечения циркуляции вируса в дикой орнитофауне и его эволюции. Дискуссионным остается вопрос и о сохранении вируса в сезонном очаге во время зимы. Существуют доказательства накопления вируса гриппа в организмах гидробионтов, в частности мидий и дафний, обитающих в природных озерах и реках. Результаты исследований зарубежных ученых показали, что в мидиях *Dreissena polymorpha* вирус не только переживает длительное время, но и накапливается [9, 11]. Изоляция вируса H5 из неконцентрированной воды

Гнездо бакланов, птенцы (июнь, 2013)



Семья бакланов (июнь, 2013)

и гидробионтов является логическим процессом приспособления существования вируса в данном биотопе ввиду сложившегося фекально-орального механизма заражения при гриппе, когда вирус выделяется с пометом диких птиц в окружающую среду, чаще всего воду, и переживает там длительное время. Гипотеза длительного сохранения вируса в воде озер была подтверждена японскими вирусологами Университета Хоккайдо при изучении циркуляции вируса гриппа в популяциях водно-болотных и околоводных птиц в Якутии [3].

По мнению академика Д.К. Львова, на всем протяжении миграционного пути, как в местах гнездований, так и в районах остановок, зимовок и т.п., касательно гриппа птиц формируются временные «миграционные» очаги заболевания и поддерживается циркуляция патогена [2].

Синантропные виды птиц являются своеобразным вектором передачи вируса между резервуаром инфекции в дикой авифауне и восприимчивой домашней птицей. Однако, ввиду того что в близлежащих районах озера Убсу-Нур местные жители занимаются исключительно пастбищным скотоводством и не практикуют разведение птицы, вспышек гриппа среди домашней птицы не регистрируют, т.к. отсутствует восприимчивый организм, нахождение которого в природном очаге привело бы к неминуемому заболеванию.

Ледоход на озере — опасное время для мониторинга (апрель, 2014)



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая анализ результатов мониторинговых исследований, следует подчеркнуть, что озеро Убсу-Нур играет важную роль не только как место остановки, кормежек и гнездования диких птиц, но и как «индикатор» заноса вируса на территорию Российской Федерации во время сезонных миграций по Центрально-Азиатскому и Восточно-Азиатскому коридорам и представляет ценный научный интерес в изучении экологии вируса гриппа птиц.

Установлена циркуляция вируса высокопатогенного гриппа птиц в популяциях дикой орнитофауны на территории убсунурского миграционного очага.

С учетом организованных экспедиций на озеро Убсу-Нур Республики Тыва Российской Федерации и полученных результатов, оптимальным временем проведения мониторинговых исследований в дикой авифауне района следует считать конец мая — начало июня.

Экспедиция проведена за счет средств по контракту с МАГАТЭ №17547/R0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ветеринарные правила лабораторной диагностики гриппа А птиц: Приказ МСХ РФ от 3.04.2006 г. № 105 // Вет. консультант. — 2006. — № 12. — С. 8–9.
2. Львов Д.К., Ильичев В.Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекции. Эколого-географические связи птиц с возбудителями инфекции. — М.: Наука, 1979. — 270 с.
3. Международное сотрудничество по изучению и охране птиц Якутии: основные итоги, новые подходы и технологии / Н.И. Гермогенов, Н.Г. Соломонов, А.Г. Дегтярев [и др.] // Птицы Сибири: структура и динамика фауны, населения и популяций / под ред. Л.Г. Вартапетова. — М., 2011. — С. 289–310.
4. Озерская Т.П. Структура населения и экология птиц Убсу-Нурской котловины: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2008. — 21 с.
5. О циркуляции вирусов гриппа А и падеже птиц на юге Центральной Сибири / А.П. Савченко, В.И. Емельянов, П.А. Савченко [и др.] // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. — 2012. — № 5 (87). — С. 310–315.
6. Полевой определитель гусеобразных птиц России / Н.Д. Поярков, А.В. Кондратьев, К.Е. Литвин [и др.]. — М., 2011. — 223 с.
7. Рябицев В.К. Птицы Урала, Приуралья и западной Сибири. — Екатеринбург, 2008. — 634 с.
8. Щелканов М.Ю. Эволюция высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии (2005–2009 гг.): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2010. — 53 с.
9. Accumulation of a low pathogenic avian influenza virus in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) / P. Stumpf, K. Failing, N. Papp [et al.] // Avian Dis. — 2010. — Vol. 54 (4). — P. 1183–1190.
10. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.4. Avian influenza / OIE. — Paris, France, 2014. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
11. Accumulation and inactivation of avian influenza virus by the filter-feeding invertebrate *Daphnia magna* / B.W. Meixell, M.A. Borchardt, S.K. Spencer // Appl. Environ. Microbiol. — 2013. — Vol. 79 (23). — P. 7249–7255.

STUDY OF AVIAN INFLUENZA VIRUS CIRCULATION IN UVS-NUUR BIRD MIGRATION AREA IN REPUBLIC OF TYVA

M.S. Volkov¹, A.V. Varkentin², V.N. Irza³, I.A. Chvala⁴, A.E. Menshikova⁵,
A.V. Andriyasov⁶, M.A. Tsivanyuk⁷, Ch.B.-O. Oyun⁸, S.V. Rogolyov⁹, M.Sh.-O. Arapchor¹⁰

¹ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Science), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: volkov_ms@arriah.ru

² Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: varkent@arriah.ru

³ IAC Chief Expert, Doctor of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: irza@arriah.ru

⁴ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: chvala@arriah.ru

⁵ Head of Sector, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: menshikova@arriah.ru

⁶ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: andriyasov_av@arriah.ru

⁷ Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: tsivanuk@arriah.ru

⁸ Deputy Head of the Department for Internal Veterinary Surveillance of the Territorial Rosselkhoznadzor Administration for the Republic of Khakassia and Tyva, e-mail: tuvshn_ozg@mail.ru

⁹ Inspector of the Territorial Rosselkhoznadzor Administration for the Republic of Khakassia and Tyva, e-mail: tuvshn_ozg@mail.ru

¹⁰ Deputy Head of the Rosselkhoznadzor Territorial Administration for Republic of Khakassia and Tyva, e-mail: rsnkhakassia@mail.ru

SUMMARY

The paper demonstrates results of long-term monitoring research performed by the FGBI "ARRIAH" in the Russian part of Uvs-Nuur Lake water area in the Republic of Tyva. The monitoring was aimed at the detection of influenza A virus circulation in the population of wild migratory birds. Ecological and biological significance of the lake coastal area in the arrangement of epidemiological investigations was determined. Highly pathogenic avian influenza virus circulation was identified in populations of wild avifauna in Uvs-Nuur migration area.

Key words: avian influenza, Newcastle disease, migratory wild bird, lake, epidemics, outbreak, natural reservoir, migration.

INTRODUCTION

Closed salted Uvs-Nuur Lake is located in the tectonic depression in the north-east part of the Uvs-Nuur basin comprising a great number of saline and fresh-water bodies. The Russian part of the lake is located in the south of the Republic of Tyva and its coastline is spread for about 10 km. The climate in the basin is highly continental with significant daily and seasonal temperature variations.

The choice of the study object was not accidental. The economic activities of the local population are limited by pastoral animal breeding thus weak impact on the ecosystem and fauna of the basin is resulted in various avifauna represented by 376 bird species including 308 nesting bird

species. The majority of transient birds include charadriiformes, anseriformes and passeriformes who stop on the lakes of the Uvs-Nuur basing during their migration along the Central Asian migration route. The water bodies of the Uvs-Nuur basin harbor a great number of waterfowl and semi-aquatic birds with the highest density of stocking in the coastal areas of Uvs-Nuur Lake due to vast reed areas and high feed capacities of the lake [4]. "Desolated" coastal area, lake swamp plain and vast reed grounds as well as feed capacities (Altai osman) attract the birds and these factors also predetermine the fixed nesting areas.

It should be pointed out that the majority of nesting and transient bird species of the Uvs-Nuur biotype are enlisted in the RF list of endangered species [4]. This fact significantly limits the capabilities for active monitoring of the lake but devastating epidemics caused by highly pathogenic avian influenza do not have mercy upon either classical or rare or extinct bird species and they destroy the stable avifauna system in the basin [5]. This statement can be supported by the results of the observations made by A.P. Savchenko, who states that great-crested grebe (*Podiceps cristatus*) was dominating bird species among those dead on the lake in 2006 and its nesting density amounted to 2.0 ths couples per 1 km². Mass deaths and spread of the infection to other species occurred at the time when the majority of great-crested grebe chicks reached 12-15-day-old age. Savchenko A.P. highlights notable ecological effects of the influenza epidemics for wild bird population on Uvs-Nuur Lake. Just during the period from 2008 to 2009 their abundance sharply decreased (by 3.5-10-fold). Here-

with, the researcher mentions that coot became extinct on the majority of the water bodies in the south part of Central Siberia and dramatically decreased the population of common pochards and garganey teals [5].

In view of the complicated global epizootic and epidemic situation, diversity of influenza A virus subtypes isolated from different bird species, complex active and passive monitoring in wild waterfowl populations is a topical and important task for practical veterinary, biological and medical sciences that is aimed at human health preservation and control of social and economic consequences of the disease outbreaks.

This work was aimed at the analysis of the results of long-term monitoring research performed in the Russian part of Uvs-Nuur Lake water area in the Republic of Tyva for the detection of influenza A virus circulation in wild migratory bird population.

MATERIALS AND METHODS

Missions to the Republic of Tyva were organized under the plan of national monitoring. Biological and pathological samples included samples of feces (pooled samples), part of intestine and brain from dead birds and blood for sera [1]. During sampling bird species were identified using bird species indicators [6, 7]. The samples were delivered to the laboratory in sealed water-proof thermal containers with cold accumulators. The samples were transported compliant to current specifications. The laboratory tests were performed according to the Veterinary Rules for Laboratory Diagnosis of Avian Influenza A and OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [1, 10].

RESULTS AND DISCUSSION

In June 2006, mass deaths of wild waterfowl were reported on Uvs-Nuur Lake in Ovyursky Raion, Republic of Tyva, Russian Federation. Total number of dead birds

amounted to 3749, the dominated species – great-crested grebe (*Podiceps cristatus*). Virological and molecular-biological test results demonstrated that the mass deaths were caused by highly pathogenic avian influenza A virus of subtype H5N1.

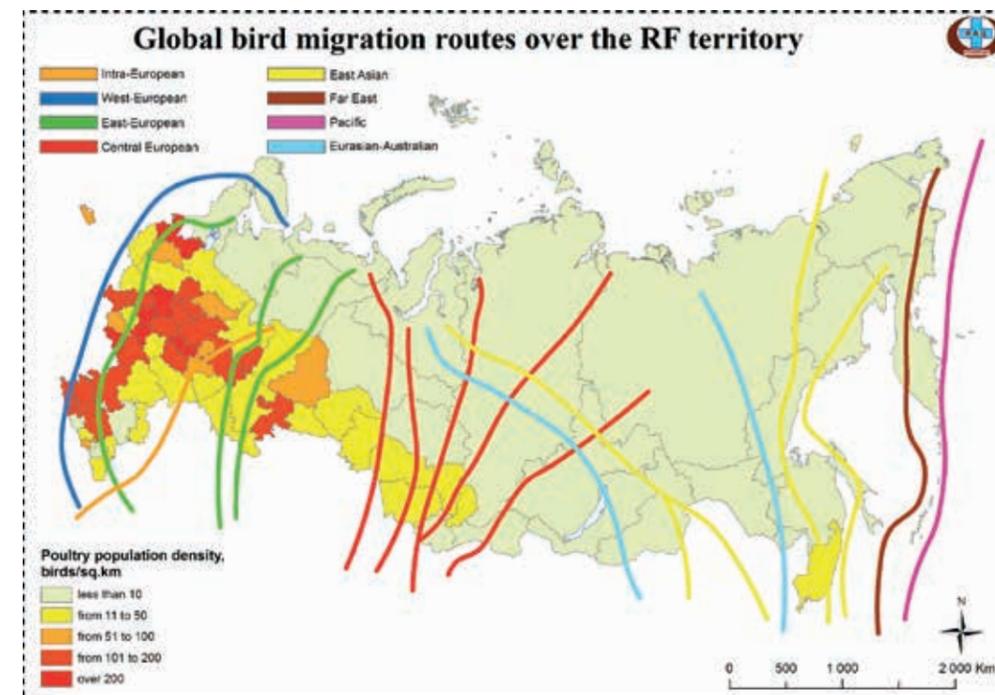
In the second half of June, 2009, 58 dead birds were found on the coastal part of the lake. The bird species included great-crested grebe (*Podiceps cristatus*), bean goose (*Anser fabalis*), spoonbill (*Platalea leucorodia*) and great black-headed gull (*Larus ichthyæetus*). Great-crested grebe was the dominating species from whose samples H5N1 influenza virus genetic material was recovered.

In June, 2010, mass mortality of wild waterfowl was again reported on the lake. 367 birds died and the cause of death was highly pathogenic H5N1 avian influenza. The involved avifauna species included great-crested grebe (*Podiceps cristatus*), goosander (*Mergus merganser*), grey heron (*Ardea cinerea*), spoonbill (*Platalea leucorodia*), gadwall (*Anas strepera*), cormorant (*Phalacrocorax carbo*), coot (*Fulica atra*), egret (*Egretta alba*), common pochard (*Aythya ferina*).

According to Dr. M.Yu. Schelkanov, in 2009 the influenza outbreak in wild bird population was etiologically related to highly pathogenic avian influenza H5N1 virus of Ussuriysk genotype 2.3.2 (Primorsky Krai). The infectious agent was introduced from South-East Asia along the Dzungarian migration route. However, "Uvs-Nuur" virus of 2006 was of different origin. Thus molecular-genetic analysis demonstrated the agent's relatedness to India-Pakistan strains and its distinction from Qinghai isolates that suggests the virus being originally introduced to Uvs-Nuur Lake from Hindostan along the India-Asian migration route [8].

Strict seasonality of birds' mass deaths on Uvs-Nuur Lake should be emphasized as all cases occurred in June.

In spite of the fact that there were no birds' mortality reported on the lake in 2011 and 2012, the FGBI "ARRIAH" experts along with the regional Rosselkhoznadzor offic-





Waterfowl colonies over their nesting sites (May, 2015)

ers annually performed active monitoring research in the coastal regions of Uvs-Nuur Lake due to previous unfavorable situation on highly pathogenic avian influenza epidemic. In 2011, 243 blood samples and 112 pathological samples from wild and synanthropic birds were tested. The test results demonstrated diagnostically relevant titers of HI A1 H5 virus antibodies ($4.0-5.0 \log_2$) in 2 sera samples from great-crested grebes (*Podiceps cristatus*). In addition, 11 samples from wild birds demonstrated H5H7 virus antibody titers of $2.0-3.0 \log_2$. Antibodies at a level below diagnostic one were detected in blood sera from black kite (*Milvus migrans*) (H5/H7), great-crested grebe (*Podiceps cristatus*) (H7), gadwall (*Anas strepera*) (H7), black-headed gull (*Larus ridibundus*) (H7) and great cormorant (*Phalacrocorax carbo*) (H7).

In 2012, no genetic material or H5 and H7 avian influenza virus specific antibodies were detected in 124 sera and 79 pathological samples collected from domestic, wild and synanthropic birds in the Republic of Tyva.

Shallowing of Uvs-Nuur Lake (May, 2015)



In 2013, monitoring research demonstrated avian influenza H5 virus antihemagglutinins were detected in sera of wild birds (gull, cormorant, gadwall).

In 2014, HI tests of 50 serum samples collected from wild waterfowl demonstrated 24 positive results. Specific H5 virus antihemagglutinins were detected in 1 sample (little gull), H7 virus antihemagglutinins were identified in 16 samples (little gull, great black-headed gull, cormorant), H9 virus antihemagglutinins – in 10 samples (little gull, great black-headed gull). Detection of specific antibodies in wild birds suggests H5, H7 and H9 virus circulation in their populations and poses real risk for the RF commercial poultry industry and ecological integrity of the biotope. In 24 biological samples influenza A virus RNA was isolated but in real-time RT-PCR with H5, H7 and H9-specific genetic primers the species specificity to these subtypes was excluded. Subtype H3 virus was identified using real-time RT-PCR in one sample from shoveler.

In the end of May 2015, the FGBI "ARRIAH" experts, officers from the Territorial Rosselkhozadzor Administrations for the Republics of Khakassia and Tyva and Rospotrebnadzor officials investigated the Russian party of Uvs-Nuur water area and performed active monitoring of



Sandpipers in the shallow water (May, 2015)

wild bird population for highly dangerous disease virus carrying (avian influenza, Newcastle disease). Two dead great-crested grebes and 2 dead mallards were found on the coast. Virological tests allowed isolation of influenza A/H5N1 virus from the dead birds. Comparative analysis of 258-nt sequences of H gene demonstrated that the tested isolates belonged to the Asian genetic lineage of highly pathogenic avian influenza (A/Guangdong/1/96 lineage, clade 2.3.2.1). According to H gene fragment the most closely related to the recovered isolates were the sequences of avian influenza A H5N1 viruses isolated in Altay Krai in 2014 (99.61-99.22% identity) and in China, Indonesia and Vietnam in 2012-2014 (98.83-98.04% identity).

Three serum samples from wild birds demonstrated diagnostically relevant titers of antibodies to Newcastle disease agent (cormorant – $6.0 \log_2$, coot – $3.0 \log_2$, cormorant – $3.0 \log_2$).

Concerns raise the reduction of the water table of the lake due to its drying (data over the past 3 years) that can affect the "flexibility" of the avicomplex on the lake.

Absence of reported dead birds in 2007-2008 cannot ground the statement on the absence of circulation of influenza viruses of different subtypes in the population of wild avifauna.

The dominating species suffered from highly pathogenic avian influenza on the lake was grebe (great-crested grebe, *Podiceps cristatus*).

In view of the tendency of the lake's shallowing and due coloniality typical for birds, the increase of migratory bird density on a limited and annually reducing territory can result in vast epidemics and death of rare and extinct bird species.

The issue of the avian influenza natural nidality has been under discussion until now. Many researchers consider influenza to be a naturally nidal non-transmissible disease. Can the coastal area of Uvs-Nuur Lake, where a huge amount of wild birds nest, be the disease natural nidus? Given that natural nidality is typical not only for transmissible diseases, the discussion of influenza nature is a topical question. In order to answer it, criteria of natural nidality should be clearly defined and compared to influenza epidemic properties in wild bird population on the lake. Natural agent's reservoir, disease seasonality and territoriality (landscape) are typical for the natural nidus. According to these criteria, natural nidus of highly pathogenic H5N1 influenza virus has been maintained on

Uvs-Nuur Lake: wild aquatic and semi-aquatic birds are the natural reservoir of the agent, where its circulation is maintained and the virus existence as a biological species is provided; the disease seasonality is also observed here as nesting and wintering sites are different that does not go against the concept of "mobility (buoyancy)" of natural niduses; the territory of the supposed natural nidus is shaped by the wild migratory bird nesting areas and feeding sites [2]. Natural and climatic conditions in the Nvs-Nuur basin are optimal for the virus circulation maintenance in the wild avifauna and for its evolution. The issue of the virus persistence in the seasonal nidus during winter is still to be discussed. There are facts of influenza virus accumulation in such aquatic organisms as mussels and daphnids inhabiting natural lakes and rivers. Foreign test results demonstrated that in *Dreissena polymorpha* mussels the virus not only survives for a long time but also accumulates [9, 11]. H5 virus isolation from non-concentrated water and aquatic organisms demonstrates the logical process of the virus adaptation to the survival in this biotope due to fecal-oral influenza infection route when the virus is shed in the environment, mostly in the water, with the wild bird feces and persists there for a long time. The hypothesis of long persistence of the virus in lake water was supported by Japanese virologists of the Hokkaido University who investigated the influenza virus circulation in the populations of wetland and semi-aquatic birds in Yakutia [3].

Flooded nest of Charadriiformes (May, 2015)





Cormorant family (June, 2013)

D.K. Lvov considers that temporary "migratory" disease outbreaks are formed along the migration route areas both in the nesting areas and in the resting or wintering areas, etc. and the agent's circulation is maintained [2].

Synanthropic birds are a specific vector of the virus transmission between the virus reservoir in the wild avifauna and susceptible birds. However, due to the fact that in the Uvs-Nuur adjacent areas local community is occupied solely with pastoral farming and do not raise poultry, no outbreaks are being reported in poultry as there is no susceptible organism whose presence in the natural nidus would have resulted in unavoidable disease.

CONCLUSION

While summing up the monitoring research results one should emphasize that Uvs-Nuur Lake plays an important role not only as a resting, feeding and nesting area for wild birds but also as an "indicator" of the virus introduction into the Russian Federation during its seasonal migrations along the Central-Asian and East-Asian routes thus being of the utmost interest for examination of the avian influenza virus ecology.

Highly pathogenic avian influenza virus circulation was confirmed in the populations of wild avifauna in Uvs-Nuur migration nidus.

With due regard of the missions sent to Uvs-Nuur Lake, Republic of Tyva, Russian Federation and their results, late

Ice drift on the lake – dangerous period for monitoring (April, 2014)



Cormorant nest, chicks (June, 2013)

May-early June should be considered the optimal time for the wild avifauna monitoring.

The missions were funded under the IAEA Project No. 17547/RO.

BIBLIOGRAPHY

1. Veterinary rules for avian influenza A laboratory diagnosis: MoA Order of 3.04.2006 No. 105 // Vet. Consultant. – 2006. – No. 12. – P. 8–9.
2. D.K. Lvov, V.D. Ilyichev Bird migrations and transmission of infectious agents. Ecological and geographic interrelations between birds and infectious agents. – M.: Nauka, 1979. – 270 p.
3. International cooperation for examination and preservation of birds in Yakutia: basic results, new approaches and methods / N.I. Germogenov, N.G. Solomonov, A.G. Degtareyev [et al] // Birds of Siberia: structure and dynamic of fauna, bird habitat and population/ edited by L.G. Vartapetov. – M., 2011. – P. 289–310.
4. T.P. Ozerskaya Habitat structure and ecology of birds in Uvs-Nuur basin: Author's abstract of the dissertation ... Candidate of Science (Biology). – M., 2008. – 21 p.
5. Influenza A virus circulation and bird mortality in the south of Central Siberia/ A.P. Savchenko, V.I. Yemelyanov, P.A. Savchenko [et al] // VSNC CO RAMN Proceeding. – 2012. – No. 5 (87). – P. 310–315.
6. Russia's Anseriformes field indicator / N.D. Poyarkov, A.V. Kondratyev, K.Ye. Litvin [et al]. – M., 2011. – 223 p.
7. V.K. Ryabintsev Birds of the Urals, Transurals and West Siberia. - Yekaterinburg, 2008. – 634 p.
8. M.Yu. Schelkanov Evolution of highly virulent influenza A (H5N1) virus in Northern Eurasia ecosystems (2005–2009): Author's abstract of the dissertation ... Doctor of Science (Biology). – M., 2010. – 53 p.
9. Accumulation of a low pathogenic avian influenza virus in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) / P. Stumpf, K. Failing, N. Papp [et al.] // Avian Dis. – 2010. – Vol. 54 (4). – P. 1183–1190.
10. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.4. Avian influenza / OIE. – Paris, France, 2014. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
11. Accumulation and inactivation of avian influenza virus by the filter-feeding invertebrate *Daphnia magna* / B.W. Meixell, M.A. Borchardt, S.K. Spencer // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 79 (23). – P. 7249–7255.

УДК 619:616.98:578.828.11:636.52/58:616-078

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЛЕЙКОЗА ПТИЦ

С.П. Лазарева¹, М.А. Волкова², Н.С. Мудрак³, И.А. Чвала⁴, Т.В. Жбанова⁵

¹ ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lazareva@arriah.ru

² ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: volkovama@arriah.ru

³ главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mudrak@arriah.ru

⁴ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chvala@arriah.ru

⁵ заведующий аспирантурой, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zhbANOVA@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Разработана тест-система на основе иммуноферментного метода для выявления антител к вирусу лейкоза птиц (ALV) при тестировании сывороток в одном разведении. Титр антител определяли по S/P отношению, измеренному в одном рабочем разведении сыворотки (1:400). Разработанная тест-система показала высокую специфичность и чувствительность в сравнении с импортным коммерческим набором.

Ключевые слова: вирус лейкоза птиц, иммуноферментный анализ, антиген, антитело.

ВВЕДЕНИЕ

Лейкозы птиц широко распространены в промышленном птицеводстве. Возбудителями лейкозов птиц являются вирусы (ALV), принадлежащие к семейству *Retroviridae*, роду *Alpharetrovirus*. ALV подразделяются на 6 антигенных подгрупп: А, В, С, D, Е, J, которые, в свою очередь, имеют в своем составе множество штаммов. Имеются данные, доказывающие возможность перекрестной нейтрализации между ALV-A и ALV-J по капсидному антигену р27, общему для всех подгрупп [4]. Экономический ущерб от ALV связан, как правило, с гибелью от вторичных инфекций и неопластических заболеваний, а также со снижением ряда производственных показателей, включая продукцию яиц и их качество. ALV способны вызывать целый ряд неопластических заболеваний, таких как лимфоидный лейкоз, миелобластоз, миелоидный лейкоз, глиомы, остеопетроз, гемангиомы и т.д. Клинические признаки заболевания проявляются у кур в возрасте старше 100 сут. [3, 5, 7].

Диагностируют заболевание по результатам лабораторных и патоморфологических исследований. Антитела к ALV периодически выявляют в образцах сывороток крови кур, поступающих как из яичных, так и из бройлерных птицефабрик Российской Федерации

(РФ) [2]. Данный факт свидетельствует о циркуляции вируса среди коммерческого поголовья птицы. Запатентованных вакцин против ALV на сегодняшний день не существует. Исходя из этого, борьба с инфекцией осуществляется путем комплектования племенного стада из хозяйств, благополучных по лейкозу птиц. Одним из способов достижения данного результата является проведение регулярного серологического мониторинга поголовья птицы с последующей выбраковкой и уничтожением больных особей [7].

В серологической диагностике ALV различных подгрупп на территории РФ в настоящее время используются коммерческие наборы для иммуноферментного анализа (ИФА), выпускаемые фирмами Zoetis, IDEXX (США). В РФ подобных тест-систем не разработано. Таким образом, разработка отечественных иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ALV является актуальной задачей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. Штамм ALV-J/CLB-908U, выделенный в 2009 г. из патологического материала, поступившего из птицефабрики Челябинской области [1]. Штамм депонирован в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». В работе использовали культуральную вирусосодержащую жидкость 3 пассажа с титром инфекционной активности 5,5 Ig ЭД₅₀/см³. Культивирование вируса проводили на первично-трипсинизированной культуре клеток фибробластов эмбрионов кур.

Антиген. Препарат антигена ALV получили согласно разработанному ранее методу [1]. Для определения концентрации типоспецифического антигена ALV в вирусосодержащих материалах использовали коммерческий набор «Avian leukosis virus antigen test kit» (Synbiotics, США) по инструкции производителя.

Электрофорез. Очищенный концентрированный антиген исследовали с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле [6].