

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»
(ФГБНУ «ФИЦ ФТМ»)

На правах рукописи

МУРАШКИНА ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

**РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГРИППА А В ПОПУЛЯЦИЯХ ДИКИХ
ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ ЗАПАДНОГО ПОБЕРЕЖЬЯ СРЕДНЕГО
КАСПИЯ**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
канд. биол. наук
Шаршов К.А.

Новосибирск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	13
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Характеристика вируса гриппа А.....	13
1.1.1 Строение вириона и структура генома вируса гриппа А.....	14
1.1.2 Цикл репродукции вируса гриппа.....	19
1.2 Антигенный дрейф вируса гриппа.....	22
1.3 Антигенный шифт вируса гриппа.....	24
1.4 Экология вируса гриппа.....	26
1.4.1 Круг восприимчивых к вирусу гриппа А хозяев.....	26
1.4.2 Влияние экологических особенностей и путей миграции различных таксонов перелетных птиц на распространение вируса гриппа.....	29
1.4.3 Высокопатогенный вирус гриппа H5N1 и H5NX у диких птиц	37
1.4.4 Другие зоонозные вирусы гриппа птиц.....	41
1.5 Характеристика орнитофауны и водных угодий западного побережья Среднего Каспия.....	43
1.6 Заключение по обзору литературы.....	50
2 СОБСТВЕННЫЕ ИСЛЕДОВАНИЯ.....	52
2.1 Материалы и методы.....	52
2.1.1 Отлов и определение видового состава диких птиц.....	52
2.1.2 Сбор и хранение клоакальных мазков птиц.....	53
2.1.3 Выделение и культивирование вирусов в системе РКЭ.....	54
2.1.3.1 Ростовые свойства в системе РКЭ.....	55
2.1.4 Проведение РГА и РТГА.....	56
2.1.5 Культивирование и титрование вируса на культуре клеток.....	57
2.1.6 Внутривенный индекс патогенности.....	59
2.1.7 Определение патогенности штаммов вируса гриппа для мышей линии BALB/C.....	59
2.1.8 Получение сывороток.....	60
2.1.9 Антигенный анализ.....	60
2.1.10 Выделение РНК.....	61
2.1.11 Реакция обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в реальном времени.....	62
2.1.12 Секвенирование.....	63

2.1.13	Филогенетический анализ.....	64
2.2	Результаты собственных исследований.....	65
2.2.1	Выбор оптимальных мест для проведения мониторинга вируса гриппа.....	65
2.2.2	Характеристика выборки птиц.....	66
2.2.3	Разнообразие и представленность вируса гриппа А в популяциях водоплавающих птиц западного побережья Среднего Каспия.....	68
2.2.4	Вирусологические характеристики штаммов вируса гриппа А.....	74
2.2.5	Молекулярно-биологический и филогенетический анализ сегментов внутренних белков.....	74
2.2.5.1	Филогенетический анализ сегмента генома PB2.....	75
2.2.5.2	Филогенетический анализ сегмент генома PB1.....	79
2.2.5.3	Филогенетический анализ сегмента генома PA.....	81
2.2.5.4	Филогенетический анализ сегмента генома NP.....	81
2.2.5.5	Филогенетический анализ сегмента MP.....	84
2.2.5.6	Филогенетический анализ сегмента NS.....	86
2.2.5.7	Заключение по разделу «Молекулярно-биологический и филогенетический анализ сегментов внутренних белков»	92
2.2.6	Биологические свойства и генетическая характеристика низкопатогенных вирусов гриппа H7N3 субтипа.....	93
2.2.6.1	Патогенность вирусов гриппа H7N3 субтипа для кур и мышей.....	93
2.2.6.2	Молекулярно-биологический анализ вирусов гриппа H7N3 субтипа.....	94
2.2.6.3	Филогенетический анализ вирусов гриппа H7N3 субтипа.....	96
2.2.6.4	Заключение по филогенетическому анализу каспийских штаммов H7N3.....	108
2.2.7	Биологические свойства и генетическая характеристика низкопатогенных вирусов гриппа H10N5 субтипа.....	109
2.2.7.1	Основные вирусологические характеристики штамма A/mallard/Dagestan/1051/2018.....	109
2.2.7.2	Молекулярно-биологический и филогенетический анализ штамма A/mallard/Dagestan/1051/2018 вируса гриппа H10N5 субтипа.....	110
2.2.7.3	Заключение по вирусу по филогенетическому анализу каспийского штамма H10 (обсуждение)	123
2.2.8	Биологические свойства и генетическая характеристика низкопатогенных вирусов гриппа H12N5 субтипа.....	125
2.2.8.1	Антигенные свойства вируса A/teal/Dagestan/1017/2018.....	125

2.2.8.2 Молекулярно-биологические свойства и филогенетический анализ вируса A/teal/Dagestan/1017/2018.....	125
2.2.8.3 Заключение по филогенетическому анализу каспийского штамма H12.....	135
2.2.9 Практическая значимость результатов исследования: формирование коллекции штаммов и депонирование в государственных коллекциях.....	140
ОБСУЖДЕНИЕ.....	142
ВЫВОДЫ.....	150
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	152
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	153
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	154
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	182
Приложение А - Регистрационные номера нуклеотидных последовательностей генов вируса гриппа, задепонированных в международной базе данных Genbank Регистрационные номера нуклеотидных последовательностей генов вируса гриппа, задепонированных в международной базе данных Genbank.....	183
Приложение Б - Справки о депонировании	184

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Вирус гриппа представляет собой один из наиболее известных патогенов, оказывающих значительное влияние на общественное здоровье и экономику всего мира. Он принадлежит к семейству Orthomyxoviridae и включает четыре отдельных рода: вирус гриппа А (Alphainfluenzavirus), вирус гриппа В (Betainfluenzavirus), вирус гриппа С (Gammainfluenzavirus) и вирус гриппа D (Deltainfluenzavirus) (A.D. Osterhaus et al., 2000). Из всех этих вирусов вирус гриппа А демонстрирует наибольшее эпидемиологическое значение, способствуя возникновению сезонных «вспышек» и пандемий (WHO, 2024). Вирус гриппа А характеризуется способностью инфицировать различные виды млекопитающих, включая лошадей, свиней, тюленей и птиц, что прежде всего приводит к эпизоотиям среди последних. Это наносит значительный экономический ущерб птицеводческой отрасли и может привести к массовому уничтожению поголовья домашней птицы (X. Li et al., 2018).

Дикие птицы, относящиеся к отрядам гусеобразных и ржанкообразных, представляют собой главный природный резервуар вируса гриппа А, при этом у них заболевание часто протекает бессимптомно, что способствует распространению инфекции во время миграции. Это подчеркивает важность эпизоотологического мониторинга данного вируса в дикой природе. Во время миграции разные экологические группы диких птиц перемещаются определенными маршрутами, выбирая благоприятные для жизни места, такие как речные долины и прибрежные зоны. При этом экологически неблагоприятные территории они преодолевают, часто на больших высотах.

Концентрация мигрирующих птиц в ограниченных областях создает идеальные условия для циркуляции вируса среди популяции. Контакты между изолированными популяциями происходят на путях миграции и в местах зимовки, что способствует географическому распространению различных штаммов вируса гриппа А (L.J. Chen et al., 2017, J.H. van der Kolk, 2019). ВГА классифицируются на субтипы по двум поверхностным гликопротеинам – гемагглютиниону (НА) и

нейраминидазе (NA). В настоящее время известно 18 субтипов гемагглютинина и 11 субтипов нейраминидазы, причем все 16 субтипов HA и 9 субтипов NA были выделены от диких птиц (Y. Kawaoka et al., 1990; C. Rohm et al., 1996, R. Fouchier et al., 2005). Субтип H17N10 и H18N11 был обнаружен только у летучих мышей (S. Tong et al., 2012).

Для эффективного контроля возбудителя необходимо систематическое наблюдение и анализ вариантов вируса, которые существуют в популяциях диких птиц. Все известные высокопатогенные штаммы вируса гриппа А относятся к одним из трех субтипов гемагглютинина: H5, H7 или H9 (Y. Bi et al., 2024). Поэтому в процессе мониторинга необходимо сосредоточиться на выявлении и анализе этих вирусных вариантов. Исследование генетических, патогенных и антигенных характеристик у субтипов H5, H7 и H9 поможет оценить риск эпизоотий и определить их полезность для диагностики соответствующего субтипа гриппа А.

Также вирусы гриппа птиц способны преодолевать барьеры между видами и передаваться людям. У вируса гриппа А наблюдается высокая скорость мутаций в геноме, что связано с процессом реассортации. Это явление может привести к возникновению особо опасных вариантов, способных инфицировать людей, таких как H5N1 (S. Ludwig et al., 1995, Korteweg and Gu, 2010). Согласно информации Всемирной организации здравоохранения (на 7 июня 2024 года), с 1 января 2003 года по настоящее время было зарегистрировано 889 случаев инфицирования людей вирусом гриппа птиц A/H5N1 в 23 странах мира. Из этого числа 463 случая закончились летальным исходом (ВОЗ, 2024).

Не менее важным является определение филогенетических связей штаммов, изолированных от птиц в различных регионах, что позволяет проследить пути географического распространения вируса в экосистемах и разработать превентивные меры против эпизоотий.

Известно, что вирус гриппа А распространён среди водно-болотных птиц, однако проводить мониторинг по всей территории их обитания не представляется возможным. Поэтому наиболее целесообразно сосредоточить усилия на

контрольных исследованиях в местах массового скопления различных популяций водно-болотных птиц. Обеспечение эпизоотологического мониторинга гриппа птиц и улучшение профилактических мер становятся важными задачами, особенно в регионах, таких как западное побережье Среднего Каспия, где подобных работ ранее не проводилось.

Степень разработанности темы исследования

Вирус гриппа птиц представляет собой один из наиболее известных патогенов, которые оказывают значительное воздействие на здоровье населения и состояние мировой экономики. Его структура стала предметом активных исследований с первой половины 1970-х годов, что стало возможным благодаря современным молекулярно-биологическим методам. За это время хорошо изучены его особенности распространения в природе, вирусологические и биологические свойства, пути передачи и репродукции в клетках хозяина, а также различные методы диагностики. Однако, из-за высокой генетической изменчивости вируса гриппа птиц периодически возникают его новые пандемические варианты, способные вызывать вспышки среди домашней птицы или преодолевать межвидовой барьер.

Мониторинг вируса гриппа птиц позволяет получить данные о современном разнообразии вариантов, оценить вероятную тенденцию его эволюционных изменений, а также обеспечивает возможность изучения биологических свойств новых вариантов вируса гриппа А.

Существуют так называемые «горячие точки» (hotspot) для мониторинга вируса, где совокупность условий позволяет проводить раннее обнаружение новых патогенных вариантов и выявить максимальное генетическое разнообразие. Подобные «горячие точки» для вируса гриппа описаны для регионов Черного и Азовского морей Украины и водно-болотных угодий Грузии. Действительно, родственные сегменты генов были обнаружены в H7 AIV у крякв в Украине в 2014 году и Грузии в 2016 году (D. Muzyka et al., 2016; D. Venkatesh et al., 2018).

Экология вируса гриппа птиц, особенно в контексте миграции диких птиц, представляет собой важную область исследования, учитывая потенциальные риски для здоровья человека и животных. Каспийский регион, как ключевая зона миграции для многих видов водоплавающих птиц, играет значительную роль в распространении вирусов гриппа, однако до настоящего времени исследования этого аспекта оставались ограниченными. Тысячи перелетных птиц разделяют экологически разнообразную среду обитания в регионе Каспийского моря, где миграционные пути из Африки и Азии пересекаются с миграционными путями в Сибирь (M. Gulyaeva et al., 2018). Вместе с тем, Каспийский регион может быть недооценен с точки зрения его роли в распространении AIV и может представлять большой интерес в качестве возможного места остановки во время миграции, где различные штаммы AIV могут подвергаться реассортации.

Таким образом, не смотря на значительную изученность вируса гриппа в целом, анализ степени разработанности темы экологии вируса гриппа птиц и его генетического разнообразия по доступным источникам выявил, что исследования в Каспийском регионе оставались ограниченными. Наряду с многочисленными данными по другим регионам, таким как Казахстан, Грузия, Западная Сибирь, западное побережье Среднего Каспия, как ключевая территория для экологии диких птиц являлась неизученной в контексте представленности и обмена вирусами гриппа между различными популяциями водоплавающих. Эти факты подчеркивают новизну и актуальность данного исследования, а также необходимость постоянного наблюдения за вирусом гриппа в популяциях диких птиц Каспийского региона и потенциальными рисками для здоровья человека и домашних животных.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение генетического разнообразия и экологических особенностей циркуляции различных субтипов вируса гриппа А в популяциях диких птиц западного побережья Среднего Каспия.

Для достижения цели были поставлены **задачи:**

1. Провести отбор проб биологического материала от диких птиц на территории западного побережья Среднего Каспия за период 2017-2020 гг.
2. Осуществить диагностику, выделение и генотипирование вируса гриппа А; изучить вирусологические свойства и сформировать коллекцию штаммов.
3. Провести анализ экологических особенностей циркуляции вируса гриппа А среди диких птиц.
4. Установить последовательности генома выделенных изолятов вируса и провести анализ филогенетических связей сегментов генома вирусов.
5. Провести анализ аминокислотных замен в основных известных генетических маркерах биологических свойств редких субтипов вируса.

Научная новизна работы. Впервые проведен мониторинг вируса гриппа А среди популяции диких птиц на ключевых орнитологических территориях западного побережья Среднего Каспия, а также установлена совместная циркуляция вируса гриппа и парамиксовируса птиц в популяциях водных и околоводных птиц исследованной территории.

Впервые выделены редкие субтипы вируса гриппа птиц. Описаны филогенетические паттерны вируса гриппа птиц редких субтипов H7N3, H10N5, H12N5 и обнаружены реассортантные штаммы у диких птиц, содержащие сегменты европейских и среднеазиатских вариантов, а также сегменты высокопатогенных вирусов гриппа.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследований представляют теоретическую и практическую ценность, так как дают возможность проведения более подробных фундаментальных исследований генетического разнообразия вируса гриппа на территории Евразии с учетом впервые обнаруженных уникальных вариантов вируса в ключевых для экологии его хозяев точках Каспийского региона. Выявленные экологические аспекты циркуляции вируса гриппа и оптимизация его мониторинга позволят улучшить меры по раннему обнаружению и контролю высокопатогенного гриппа среди животных в регионе.

Создана и принята на патентное депонирование в Государственную коллекцию вирусов гриппа и ОРЗ (Лаборатория эволюционной изменчивости вирусов гриппа отдела этиологии и эпидемиологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России) коллекция штаммов вируса гриппа H3N8, H1N1, H7N3, H10N5, H12N5, H8N4, H4N6-субтипов. Выделенные штаммы могут быть использованы в диагностических целях, в частности, при разработке тест-систем в качестве контрольных образцов, а также в качестве штаммов-продуцентов для создания вакцин для сельскохозяйственных птиц. Полученные нуклеотидные последовательности опубликованы в Базе данных GISAID и могут быть использованы при дизайне праймеров и создании контрольных препаратов, содержащих генетический материал вируса. Данные о видах-хозяевах вируса, полученные в результате мониторинга позволяют предполагать более вероятные пути распространения вируса гриппа. Разработанную карту-схему ключевых точек исследования вируса гриппа у диких птиц предлагается применять в качестве составной части методических рекомендаций для мониторинга высокопатогенного гриппа птиц в Каспийском регионе.

Методология и методы исследования.

В работе были использованы вирусологические, серологические, молекулярно-генетические, статистические методы исследования. Методология диссертационной работы спланирована в соответствии с ее структурой и задачами исследования. Объектами научного исследования являлись изоляты и штаммы вируса гриппа А. Научная литература, касающаяся тематики исследования, была проанализирована формально-логическими методами.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Оптимизированный протокол мониторинга вируса гриппа у диких птиц западного побережья Среднего Каспия, основанный на выборе и обосновании ключевых точек и его результаты за период 2017-2020 гг.
2. Основные молекулярно-биологические свойства, а также результаты филогенетического анализа сегментов генома выделенных штаммов вируса

3. Характеристика редких субтипов вируса, выделенных в Каспийском регионе (H7N3, H10N5, H12N5) от диких водоплавающих птиц, их биологические свойства и генетические особенности

4. Филогенетические паттерны сегментов генома NP и MP выделенных штаммов и их принадлежность к евроазиатским филогенетическим кладам

5. Характеристика консервативного сегмента неструктурного белка NS у выделенных штаммов и доказательства его принадлежности к ранее описанным аллелям A и B.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, подтверждена статистической обработкой данных, актами комиссионных испытаний, утвержденных в установленном порядке. Основные результаты исследований были доложены на: 56-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2018: (Новосибирск, 2018), XX Юбилейной Международной научной конференции «Биологическое разнообразие Кавказа и юга России», посвященной памяти выдающегося ученого, доктора биологических наук, Заслуженного деятеля науки РД и РФ, академика Российской экологической академии, профессора Гайирбега Магомедовича Абдурахманова (Махачкала, 2018), X-ой Международной конференции «Морские млекопитающие Голарктики», посвященной памяти А.В. Яблокова (Архангельск, 2018), 57-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2019: Биология (Новосибирск, 2019), XXV Международной научной конференции с элементами школы для молодых ученых «Влияние изменения климата на биологического разнообразие и распространение инфекций в Черноморско-Каспийском регионе» (Махачкала, 2023), V International scientific conference (Novosibirsk, 2023).

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликованы 10 научных работы, в том числе 2 статьи в рецензируемом научном журнале, рекомендованном ВАК Минобрнауки РФ («Юг России: экология, развитие»); 2 статьи – в базах, индексируемых Scopus (Viruses, Microorganisms).

Объем и структура работы. Работа изложена на 192 страницах компьютерного текста и состоит из обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, списка литературы, который включает в себя 234 источника, в том числе 205 работ зарубежных авторов и 9 интернет-источников. Диссертационная работа содержит 11 таблиц, 46 рисунков, 2 приложения.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность всем сотрудникам лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоразнообразия вирусов и других подразделений НИИ вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»; сотрудникам Института Экологии и устойчивого развития Дагестанского государственного университета за помощь в выполнении настоящей работы.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика вируса гриппа А

Все возбудители гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*, и представлены четырьмя отдельными родами: вирус гриппа А (*Alphainfluenzavirus*), вирус гриппа В (*Betainfluenzavirus*), вирус гриппа С (*Gammainfluenzavirus*) и вирус гриппа D (*Deltainfluenzavirus*). Помимо них в семейство *Orthomyxoviridae* входят вирусы родов *Quaranjavirus*, *Thogotovirus* и *Isavirus*, *Mykissvirus*, *Sardinovirus* поражающие членистоногих, рыб и зайцеобразных млекопитающих (A.D. Osterhaus et al., 2000). В мировой литературе для обозначения вируса гриппа птиц (avian influenza virus) общепринято применение аббревиатуры AIV; в данной работе использовался данный термин для обозначения вируса гриппа птиц.

Геном вируса гриппа А представляет собой сегментированную однонитчатую РНК негативной полярности (т.е. для того, чтобы синтезировать вирусные белки в клетке необходимо образование комплементарной информационной мРНК). Такой вид генома является основой для реассортации генов, благодаря которой возникает возможность появления новых вариантов вирусов (P. Palese et al., 2001).

Из-за высокой генетической изменчивости AIV периодически возникают его новые пандемические варианты. Важным аспектом этого процесса является его способность к репродукции в организмах различных видов млекопитающих и птиц (О.К. Кузнецов и др., 2003).

Антигенная изменчивость в первую очередь касается гемагглютиниона (НА) и нейраминидазы (НА) - поверхностных белков вируса гриппа. Внутренние белки (NP и матриксный белок М) также склонны к изменчивости, но в значительно меньшей степени и остаются относительно стабильными.

Основными механизмами антигенной изменчивости являются дрейф и шифт. Антигенный дрейф является результатом точечных мутаций в геноме одного или нескольких нуклеотидов. При антигенном шифте происходит

реассортация, т.е. происходит замена генов, которые определяют антигенные характеристики вируса. В результате образуются вирусные единицы с новыми антигенными свойствами, имеющими новый эпидемический потенциал, благодаря которому увеличивается способность реассортантов преодолевать межвидовые барьеры (И.А. Соболев и др., 2016).

1.1.1 Строение вириона и структура генома вируса гриппа А

Вирус гриппа и его структура стала предметом активных исследований с первой половины 1970-х годов, что стало возможным благодаря современным молекулярно-биологическим методам. Актуальность этих исследований не исчезает и сегодня, поскольку геном вируса играет критическую роль в его развитии внутри клетки и в процессе инфекции. Размер частицы в среднем варьирует от 80 до 120 нм, и, в основном, имеет сферическую или продолговатую. Вирион окружен двухслойной липидной мембраной, в которой заключен геном вируса, состоящий из восьми сегментов одноцепочечной РНК негативной полярности (рисунок 1).

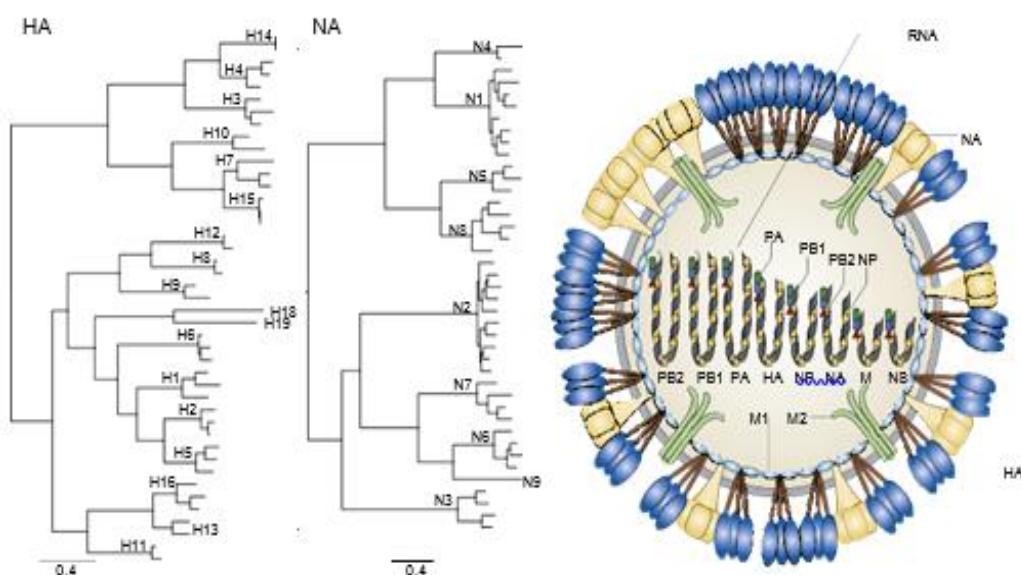


Рисунок 1 – Вирус гриппа А и генетическая вариабельность поверхностных гликопротеинов HA и NA. Филогенетические деревья демонстрируют генетическую вариабельность генов поверхностного гликопротеина HA и NA в резервуаре диких птиц, а в случае HA включают недавно обнаруженные вирусы H17 и H18 от летучих мышей. Схематическое представление вирусной частицы гриппа А с ее восемью сегментами гена РНК

(G. B. Karlsson Hedestam et al., 2008)

Все белки вириона вируса можно разделить на поверхностные (НА, NA, M2) и внутренние (A.M. Smith et al., 2018). Сегменты 1-3 кодируют белки (полимеразы), которые вместе образуют полимеразный комплекс: полимеразный белок 2 (PB2), полимеразный белок 1 (PB1) и полимеразный белок (PA) соответственно. Второй сегмент также кодирует два дополнительных белка, PB1-F2 и PB1-N40, которые имеют важное значение в индукции гибели клеток. (G.M. Conenello et al., 2007). Сегмент 3 экспрессирует PA-X с открытой рамки считывания и принимает участие в модуляции иммунного ответа клеток (B.W. Jagger et al., 2012). Сегменты 4 и 6 кодируют два важнейших белка: вирусные поверхностные гликопротеины НА и NA, где гемагглютинин (НА) отвечает за рецепторное связывание с сиаловыми кислотами, на клетках-хозяевах, и за слияние вируса и клетки-хозяина при эндоцитозе. Его шип представляет собой тример с молекулярной массой около 70 кДа. Нейраминидаза (NA) также представляет собой поверхностный белок вируса гриппа (X. Cheng et al., 2012; M. Nakano et al., 2021). Она участвует в удалении сиаловой кислоты от НА и способствует освобождению новых вирионов с поверхности клетки и распространению вируса в организме. Шип NA представляет собой тетрамер и имеет молекулярную массу 240 кДа. (L. Byrd-Leotis et al., 2017). Нейраминидаза (NA) является сиалидазой, ответственной за отщепление сиаловых кислот от продуцирующих вирус клеток-хозяев и вирусных частиц, тем самым облегчая высвобождение вируса. Сегмент 5 кодирует нуклеокапсидный белок (NP). Он вместе с белками полимеразы образует рибонуклеопротеиновые комплексы путем связывания с вирусной РНК.

Структурный белок вирусного матрикса М1 и белок ионного канала М2, встраиваемый в мембрану вируса, кодируются сегментом 7. Важную роль играет сегмент 8: он экспрессирует неструктурный белок NS1 и белок экспорта нуклеиновых кислот (NEP), ранее называемый NS2. В то время как NEP участвует в сложных процессах ядерного экспорта РНП в цитоплазму перед сборкой вириона, белок NS1 препятствует экспрессии генов хозяина, и, по сути,

является антагонистом врожденных иммунных реакций хозяина (E.C. Hutchinson et al., 2018).

Далее представлены основные особенности белков вируса гриппа, важные для жизненного цикла. Считается, что третьим поверхностным белком является мембранный белок М2. Он представляет собой небольшую молекулу белка с массой 11 кДа, длиной 97 аминокислотных остатков. М2 отвечает за образование ионного канала и регуляцию рН в процессе освобождения внутренних частей и компонентов вирусной частицы в эндосомах и на аппарате Гольджи (место синтеза НА). Репродукция вируса значительно снижается при инаktivации ионного канала (R.M. Pielak et al., 2011).

На долю мембранный белка М1 приходится до 40% всей массы белка вириона, и его главная структурная функция – это выстилание внутренней поверхности липидного слоя. Его молекулярная масса в среднем равна 25 кДа. Белок М1 очень точно локализуется поверхностными белками при сборке вирусной частицы в клетке и активно взаимодействует с ними. Помимо этого, он непосредственно контактирует с нуклеопротеином и с РНК вируса (L.V. Kordyukova et al., 2019). Играя важнейшую роль в транскрипции вирусной РНК, белок М1 контролирует нуклеоплазматический транспорт рибонуклеопротеинов в зараженной клетке., а также влияет на образование определенной формы вириона в процессе его формирования и отпочковывания.

Нуклеопротеин (NP) изучен достаточно хорошо, и отнесен к внутренним белкам вириона и взаимодействует с белком М1, РНК, белками полимеразного комплекса. Составляя 17-20% от всей массы белков вирусной частицы, он имеет молекулярную массу равную 50 кДа. В структуре NP содержатся специфические аминокислотные последовательности, которые называют последовательностью ядерной локализации. Они играют ключевую роль при транспорте вирионной РНК в ядро клетки и, далее, из ядра к месту сборки вирионов. Кроме того, важнейшей функцией является взаимодействие с РНК и мультифункциональным комплексом - РНК-зависимой РНК-полимеразой, в состав которой входит 5 белков: PB1, PB1-F2, NP40, PB2 и PA (T. Noda et al., 2006).

Белок NS1 имеет молекулярную массу 26 кДа и состоит из 230-236 аминокислотных остатков. Основная его функция – опосредованное участие в регуляции репродукции вируса гриппа в клетке; защитная функция от действия клеточный интерферонов. Второй небольшой белок NS2, состоящий всего из 112 аминокислотных остатков, принимает непосредственное активное участие в транспорте РНП комплексов, благодаря чему он получил название белка ядерного экспорта (NEP). Информация о белках NS2 и NS1 закодирована в 8-м сегменте РНК генома вируса гриппа (R.A. Lamb et al., 1983).

Оба белка играют ключевую роль в репликации. В связи с этим они рассматриваются в качестве мишеней для разработки новых лекарств. NS1 является многофункциональным белком и важен для выхода из иммунной системы хозяина (B.G. Hale et al., 2008). NS1 блокирует синтез α/β интерферонов (M.J. Kim et al., 2002; P. Jiao et al., 2008;). NS1 — это РНК-связывающий белок, который участвует в регуляции многих клеточных процессов. (R.M. Krug et al., 2015; K.E. Sloan et al., 2016; A.C. Vicary et al., 2023). NS1 снижает как синтетические, так и легочные противовоспалительные цитокины (L. Hyland et al., 2006). Впервые NS2 был описан как часть очищенных вирусных частиц и в ядре инфицированных эукариотических клеток (M.J. Kim et al., 2002). NS2 также известен как NEP и участвует в транспорте РНК и полимеразного белкового комплекса во время репликации, по сравнению с NS1, который менее описан (H. Akarsu et al., 2011). Ряд исследований показал участие NS2 в регуляции вирусной репликации РНК (J.T. Perez et al., 2010; A. Varble et al., 2010).

Вирусы гриппа А очень изменчивы. Наиболее выраженной является генетическая и антигенная вариабельность поверхностных гликопротеинов HA и NA (S. W. Yoon et al., 2014). На сегодняшний день у птиц обнаружено 16 основных антигенных вариантов HA и 9 антигенных вариантов NA. Из возможных 144 комбинаций HA/NA у птиц в природе было зарегистрировано 127 субтипов GISAID. В дополнение к вирусным подтипам, обнаруженным у птиц, у летучих мышей были обнаружены два новых вируса гриппа А, которые номинально были классифицированы как H17N10 и H18N11 (Tong S. et al., 2012;

Tong S. et al., 2013). Однако нейраминидазы этих вирусов отдаленно связаны с N1-N9 NA птичьего гриппа и лишены консервативных аминокислотных остатков, участвующих в связывании или расщеплении сиаловой кислоты (A. García-Sastre, 2012). Система классификации имеет биологическое значение, поскольку антитела хозяина, распознающие один подтип HA или NA, не будут перекрестно реагировать или слабо реагировать с другими подтипами HA или NA. Антигенная вариабельность белков HA и NA согласуется с основной генетической вариабельностью соответствующих генов вирусов птичьего гриппа А (см. рисунок 1). Например, максимальная идентичность аминокислотных последовательностей между HA любых двух различных подтипов HA птичьего гриппа (H1-H16) составляет 79%, а внутри подтипа может достигать 86% (R.A.M. Fouchier et al., 2005). Генетическая вариабельность генов HA и NA в птичьем резервуаре того же порядка величины, что и генетическая вариабельность поверхностных гликопротеинов лентивирусов приматов, общеизвестно изменчивой группы вирусов (G.B. Karlsson Hedestam et al., 2008).

Помимо классификации, которая основывается на антигенных свойствах HA и NA, вирусы гриппа птиц можно быть классифицировать на основе их патогенного фенотипа у цыплят. Различают вирусы низкопатогенного птичьего гриппа (Low pathogenic avian influenza, LPAI) и высокопатогенного птичьего гриппа (Highly pathogenic avian influenza, HPAI). Подавляющее большинство вирусов птичьего гриппа являются LPAI и вызывают либо легкое заболевание, либо отсутствие симптомов в зависимости от вируса и инфицированного вида. Однако два подтипа гриппа, H5 и H7, также потенциально могут проявляться как вирусы HPAI. Вирусы HPAI классифицируются как те, которые вызывают более 75% смертности у цыплят после внутривенного заражения, и, как полагают, возникают у домашней птицы при проникновении вирусов HPAI H5 и H7 из резервуара дикой птицы (D.J. Alexander, 2000; I.P. Chatziprodromidou, 2018). Белок HA вируса гриппа А первоначально синтезируется в виде единственного полипептидного предшественника (HA0), который расщепляется на субъединицы HA1 и HA2 трипсиноподобными протеазами в клетке-хозяине. Переход от

фенотипа вируса LPAI к фенотипу вируса HPAI для вирусов H5 и H7 достигается введением основных аминокислотных остатков в сайт расщепления HA0, облегчая расщепление повсеместно экспрессируемыми протеазами (T.J Hu et al., 2018). Считается, что это свойство способствует системной репликации вируса и смертности до 100% среди домашних птиц (A.C. Hurt et al., 2017).

1.1.2 Цикл репродукции вируса гриппа

Жизненный цикл вируса гриппа условно можно разделить на несколько последовательных этапов (рисунок 2):

- адсорбция на клетке;
- проникновение в клетку;
- “раздевание” вируса внутри клетки;
- транскрипция;
- трансляция информационных РНК;
- репликация генома;
- сборка вирусных компонентов и выход вируса из клетки (Н.В. Литусов и др., 2012).

Начало взаимодействия вируса с клеткой с момента прикрепления его частиц к клеточной оболочке – это адсорбции, одна из главных стадий репродукции вируса, так как от нее зависит сама способность инфицирования клетки. Адсорбция вируса происходит в результате взаимодействия поверхностных вирусных антигенов с остатками сиаловых кислот. Основная их масса находится на поверхностных гликопротеинах клетки. Ионные каналы при помощи закисления среды снижают рН внутри вирусной частицы, вследствие чего происходит разрушение белковой оболочки M1, определяя, в свою очередь, основной путем проникновения вируса в клетку - эндоцитоз (Е.П. Пашков и др., 2003).

Вместе с этим происходит активация НА, который является одним из главных компонентов «машины слияния». Далее, в цитоплазму входит нуклеокапсид, чему предшествует смыкание мембраны вируса и клеточной

полноразмерную вРНК и используются для сборки новых вирионов. Принципиальным условием формирования инфекционной вирусной частицы является наличие как минимум по одной копии каждого из сегментов РНК (Т.Н. Ильичева и др., 2012).

После копирования вирусных РНК в ядре клетки, они объединяются в новые вирусные частицы и формируют оболочку из белка NP и затем передвигаются в цитоплазму, где соединятся с белками полимеразного комплекса PA, PB1, PB2. Сборка новых вирионов гриппа происходит одновременно с их высвобождением из клетки посредством почкования (Р.Г. Госманов и др., 2018).

Благодаря действию нейраминидазы отпочковавшиеся вирусные частицы избегают присоединения к рецепторам сиаловой кислоты на поверхности инфицированной клетки, т.к. NA удаляет остатки сиаловой кислоты с поверхности зараженной клетки, освобождая путь для выходов новых вирионов (L. Byrd-Leotis et al., 2017).

Вирусы гриппа реплицируются в столбчатых эпителиальных клетках дыхательных путей (N.M. Bouvier et al., 2010) и распространяются через дыхательные выделения в виде мелких аэрозольных частиц, образующихся при чихании, кашле и разговоре (M. Imai et al., 2013).

Подтипы H1N1 и H3N2 (грипп А) и грипп В в настоящее время циркулируют в человеческой популяции (B. Jones, 2012), распространенность этих трех штаммов гриппа может варьироваться во времени или географически внутри стран, между странами или континентами в течение одного сезона гриппа (G.A. Sautto et al., 2018). Начальной стадией гриппозной инфекции является связывание вириона с поверхностью клетки-хозяина.

После успешного прикрепления вируса к рецептору происходит слияние мембран и образуется новая оболочка вокруг вириона (L. Nyland et al., 2006). На следующем этапе формируется новый компартмент (эндосома), после чего клетка-хозяин начинает переваривать эндосому. Снижение pH (<6,0) приводит к активации НА. Тример становится нестабильным и частично разворачивается (T.J. Hu et al., 2015). Внутреннее содержимое вириона высвобождается в

цитоплазму клетки-хозяина после слияния мембран. Вирусный РНК-полимеразный комплекс и РНК-зависимая РНК-полимераза транспортируются в цитоплазму клетки-хозяина (К.А. Hooper et al., 2013; T.J. Hu et al., 2015). Впоследствии полимеразный комплекс транспортируется в ядро клетки-хозяина, где РНК-зависимая полимераз производит положительную комплементарную кРНК, которая экспортируется в цитоплазму и транслируется или остается в ядре. Вирусы гриппа не способны кодировать ферменты для продуцирования 5'cap на своей собственной мРНК. 5'cap отщепляется от мРНК хозяина, а затем связывается с мРНК вирусов (J. Hu et al., 2015). Вновь синтезированные вирусные белки транспортируются с помощью аппарата Гольджи на поверхность клетки или транспортируются в ядро, где они связывают вРНК и способствуют сборке новых вирионов. Синтезированная РНК содержит множество неисправленных ошибок (по одному нуклеотиду на каждые 10 кбит/с), что приводит к тому, что почти каждый вирус содержит мутацию (D. Dou et al., 2018).

Другие вирусные белки обладают широким спектром функций, таких как расщепление клеточной мРНК с получением нуклеотидов для синтеза вРНК или ингибирование трансляции мРНК хозяина. вРНК и синтезированные вирусные белки собираются в форме новых вирионов внутри клетки-хозяина (X. Cheng et al., 2012). Для выхода новообразованных вирионов из клетки-хозяина рецепторы сиаловой кислоты должны быть ферментативно расщеплены (этот рецептор использовался для связывания вируса при ранней инфекции с помощью НА) (W. Chen et al., 2001; V. Garcia et al., 2014). Гибель клетки-хозяина происходит после высвобождения вновь реплицированных вирионов (L. Krejcová et al., 2015).

1.2 Антигенный дрейф вируса гриппа

Вирусы гриппа способны обходить опосредованный антителами иммунитет, индуцированный во время предыдущих инфекций или вакцинаций, путем постепенного накапливая мутации в НА и NA (рисунок 3). Этот процесс, известный как антигенный дрейф, требует частого обновления вакцин против

гриппа, для обеспечения достаточного антигенного родства между вакциной и появляющимися вариантами вируса.

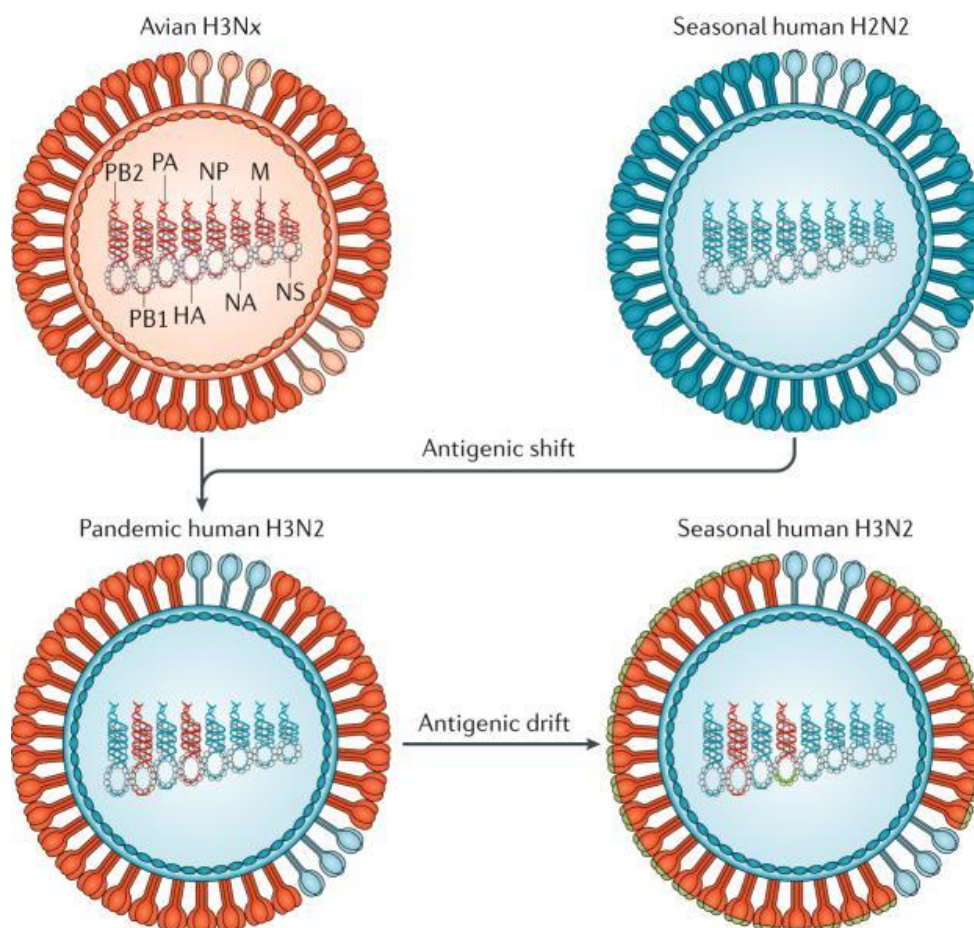


Рисунок 3 – Антигенный сдвиг гриппа и антигенный дрейф (F. Krammer et al., 2018)

Поскольку НА в настоящее время является основным компонентом инактивированных вакцин против гриппа, существуют программы эпиднадзора за вирусом гриппа человека и животных для мониторинга антигенных изменений вируса, в первую очередь с использованием анализа ингибирования гемагглютинации и анализа последовательности вирусной РНК (M.L. Killian, 2014; I.G. Barr et al., 2014). Повышенное внимание к антигенному дрейфу НА, измеренному с помощью анализов ингибирования нейраминидазы, может еще больше повысить антигенное

соответствие между вакцинами и циркулирующими вирусами (E.D. Kilbourne et al., 1968; L. Couzens et al., 2014; M.L. DeDiego et al., 2018).

Кроме того, наблюдался антигенный дрейф эпитопа Т-клеток, но не так часто, как дрейф, опосредованный антителом (N. Tewawong et al., 2015). Вычислительные методы, так называемая антигенная картография, позволяют проводить количественный анализ и визуализацию данных анализа ингибирования гемагглютинации и данных анализа ингибирования нейраминидазы (D.J. Smith et al., 2004).

Эти методы количественной оценки антигенного дрейфа штаммов вируса гриппа, наряду с исследованиями сайт-направленного мутагенеза, показали, что существенный антигенный дрейф может быть вызван одной или очень небольшим количеством аминокислотных замен, расположенных рядом с функциональными сайтами в головке (но не в ножке) белка НА (B.F. Koel et al., 2013, B.F. Koel et al., 2014). Было показано, что антигенная эволюция вирусов гриппа у вирусов гриппа человека протекает быстрее, чем у вирусов свиней и лошадей, что, предположительно, связано с размером, смешением и возрастной структурой (то есть люди имеют более продолжительную продолжительность жизни, чем свиньи и лошади) популяций хозяев (D.J. Smith et al., 2004; N.S. Lewis et al., 2011; W.N. Harrington et al., 2021).

У диких птиц, у которых циркулируют многочисленные подтипы вируса птичьего гриппа А, антигенная вариабельность НА и NA внутри подтипа, по-видимому, ограничена. Однако при введении домашней птице были отмечены антигенные вариации внутри подтипов птичьего вируса, возможно, связанные с селективным давлением антител, вызванным использованием вакцины (S. Tong et al., 2012).

1.3 Антигенный шифт вируса гриппа

В отличие от антигенного дрейфа, антигенный шифт (сдвиг) относится к резким изменениям антигенности НА циркулирующих вирусов гриппа А; антигенный шифт связан с пандемиями гриппа А. Молекулы НА, а иногда и NA

пандемических вирусов получены из антигенно разнообразных штаммов вируса гриппа животных, которые могут быть приобретены штаммами гриппа человека путем повторной сортировки (см. рисунок 3).

Пандемические вспышки обычно связаны с исчезновением предыдущих циркулирующих штаммов. Однако в 1977 году вирусы гриппа А H1N1, не встречавшиеся у людей со времен пандемии гриппа А H2N2 1957 года, начали совместно циркулировать с вирусами гриппа А H3N2 (A.P. Kendal et al., 1978). Пандемия гриппа А H1N1 2009 года была вызвана вирусом гриппа А H1N1, который антигенно сильно отличался от циркулировавшего в то время вируса сезонного гриппа А H1N1 и привел к исчезновению предыдущей человеческой линии гриппа А H1N1, но это не привело к исчезновению вирусов гриппа А H3N2. С 2009 года вирусы гриппа А H3N2 и гриппа А H1N1, полученные из вируса пандемии 2009 года, и две линии вируса гриппа В совместно циркулируют среди людей. Ограниченное число произошедших пандемических событий очень затрудняет прогнозирование следующей пандемии.

Инфекции, вызванные вирусом гриппа человека, антигенно разнообразными вирусами гриппа птиц H5N1, H7N9, свиного гриппа H3N2 и другими вирусами гриппа животных, постоянно выявляются в географических регионах, где эти штаммы распространены из-за контакта инфицированной домашней птицы или свиней с людьми. Однако с этими вирусами не было связано ни одного случая устойчивой передачи от человека к человеку, что указывает на необходимость дальнейшей адаптации вируса для того, чтобы передаваться от человека к человеку. Неясно, насколько возможно, чтобы эти вирусы адаптировались к передаче от человека к человеку сохраняя вирулентность. Тогда как для адаптации вируса гриппа А H5N1 на хорьках, которых часто используют в качестве животной модели заражения вирусом гриппа человека, требуется всего несколько изменений (J. Zhou et al., 2018).

1.4 Экология вируса гриппа

1.4.1 Круг восприимчивых к вирусу гриппа А хозяев

Вирусы гриппа А широко распространены в природе и поражают множество позвоночных животных, включая лошадей, свиней, норок, морских млекопитающих, а также различные отряды птиц (рисунок 4). Птицы играют ключевую роль как основной природный резервуар, поскольку среди них выявлено 16 подтипов НА и 9 подтипов NA. С 1961 года вирус птичьего гриппа был зарегистрирован почти у 100 видов из двенадцати различных отрядов птиц. Наибольшее количество видов принадлежит отряду Anseriformes (дикие утки и гуси), а по меньшей мере 20 видов относятся к отряду Charadriiformes (цапли, ржанки и крачки). Особый интерес представляют птицы, которые распространены по всему земному шару и мигрируют на большие расстояния (I.P. Chatziprodromidou, 2018).

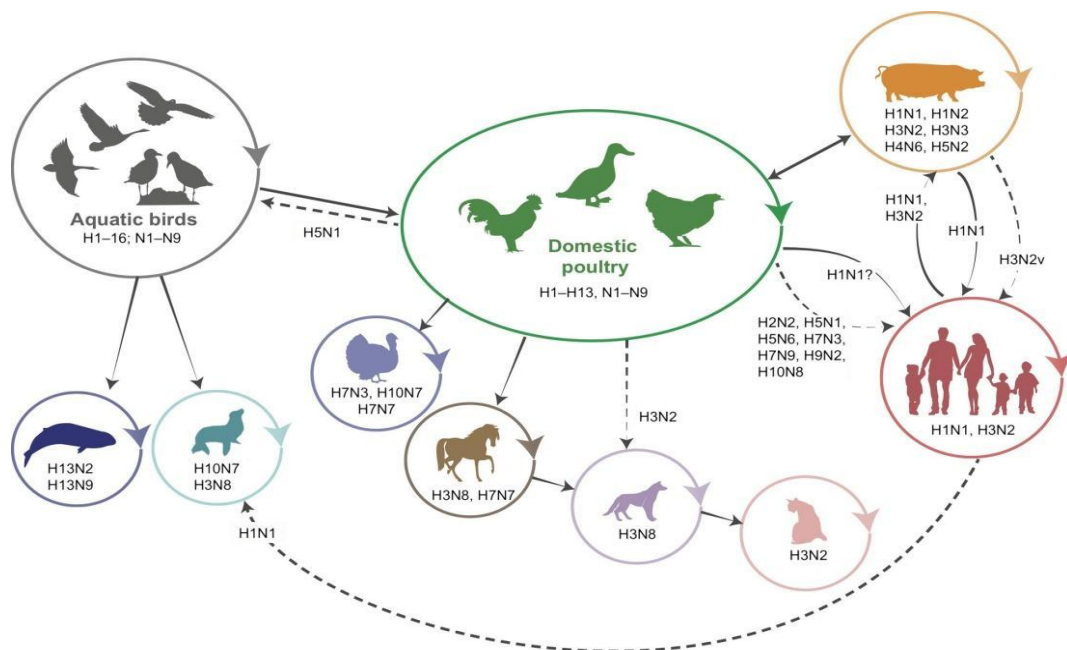


Рисунок 4 – Круг восприимчивых к вирусу гриппа А хозяев (U. Joseph et al., 2017)

Известно, что водоплавающие птицы играют ключевую роль в циркуляции и распространении вирусов гриппа. Фекально-оральный способ передачи является наиболее эффективным среди птиц; они переносят вирус в кишечнике и выделяют в окружающую среду вместе со слюной и фекалиями. Благодаря долговременной

адаптации вируса к резервуару, течение болезни у птиц может протекать бессимптомно. Однако некоторые штаммы способны вызывать в природе обширные эпизоотии и массовую гибель диких и домашних птиц (например, H5 и H7) (М.М. Hassan et al., 2020).

Исследования циркуляции на территории Америки и Евразии показали различные закономерности, зависящие от общей картины миграций диких птиц на континентах. Миграции по широте одинаково влияла на распространение вирусов на разных континентах, в то время как миграция по долготе влияла на скорость распространения новых штаммов, например в Азии, а также вносило решающий вклад в эволюционные процессы данного патогена (A. Suttie et al., 2019).

Высокопатогенные штаммы вируса H5N1 способны вызывать массовую гибель не только птиц (как диких, так и домашних), но и инфицировать млекопитающих, включая человека. Причем смертность в случае такой инфекции превышает 50%, что делает А (H5N1) субтип крайне актуальным в настоящее время.

Случаи заболевания высокопатогенной формой гриппа птиц (H5N1) у людей отмечались с конца 90-х годов. Более 20 человек были госпитализированы, из них 6 человек погибло в 1997 году в Гонконге, когда вирус А (H5N1) впервые преодолел межвидовой барьер от кур к человеку. Было показано, что люди заражались на прямую от птиц. В последствии, при ликвидации эпизоотии, было принято решение по уничтожению свыше 1 млн особей домашней птицы. (S. Lai et al., 2016).

Беспрецедентные вспышки гриппа птиц H5N1, произошедшие в 2005 году на территории Китая, Монголии, Казахстана, России, Хорватии, Румынии, Турции, подтверждают передачу вируса мигрирующими птицами – была обнаружена ассоциация распространения вируса с основными сезонными путями миграции перелетных птиц (Л.В. Саяпина и др., 2016).

Большинство пандемий, вызванных вирусом гриппа, начинались в Азии, где высока плотность населения, живущего к тому же в непосредственной близости к местам разведения уток и свиней (M. Javanian et al., 2021). При этом пандемические штаммы содержали сегменты вирусов гриппа птиц: например,

пандемия 1918 года названная «Испанка» также была вызвана штаммом, имеющим сегменты вирусов птиц.

Свины играют важную роль в возникновении новых вариантов вирусов, так как они восприимчивы как к птичьим, так и к вирусам, циркулирующим среди людей. Филогенетические исследования показали, что сегменты вируса гриппа свиней произошли от генетического пула птичьих вирусов. При этом установлено, что вирус гриппа человека и вирус гриппа свиней филогенетически имеют близкое родство, что свидетельствует о их общем происхождении. Исследования позволяют сделать вывод, что наиболее вероятно, что вирус гриппа человека и классический вирус гриппа свиней произошли от птичьих вариантов. В то же время, вирусы гриппа свиней, изолированные в различных регионах мира, демонстрируют значительные генетические различия (W. Ma, 2020).

Вирусы гриппа, выделенные от свиней в Европе, Азии и Северной Америке, образуют отдельные генетические линии внутри одного и того же субтипа по поверхностным белкам NA и HA (K. Van Reeth et al., 2019). Обнаружена консервативность североамериканской линии – она сохраняет относительную стабильность на протяжении около 80 лет и состоит из одного доминантного субтипа. Последний получил название «классический “свиной” грипп А (H1N1)» и состоит из сегментов преимущественно свиного происхождения. При исследовании антигенных свойств обнаружена схожесть с таковыми у первого штамма вируса свиней H1N1, который был изолирован в 1930 г.

Другой самый распространенный среди свиней субтип H3N2 был впервые детально изучен в 1998 г. Он впервые был обнаружен популяции свиней в США и содержал от вирусов человека (HA, NA и PB1), птиц (PA и PB2) и свиней (M, NS и NP). Ожидаемо, подобное проникновение вируса H3N2 в популяцию свиней привело к появлению в США различных реассортантных штаммов (D.S. Rajao et al., 2017).

Значительное сходство генетических и антигенных свойств между вирусами грипп человека и свиней привело к гипотезе существования специфического

резервуара в свиньях. Его называли «смешивающим сосудом», в котором вирусы гриппа птиц адаптируются к млекопитающим, включая человека (W. Ma et al., 2009).

Установлено, что НА вирусов гриппа птиц связывается с остатками сиаловой кислоты клеточных рецепторов при помощи связи альфа (2,3), а вирусов человека при помощи альфа (2,6). Респираторный тракт свиней имеет оба типа рецепторов, что увеличивает вероятность одновременного заражения и репликации в организме свиней вирусов разных субтипов, а также генетической реассортации между этими вирусами (S.V. Kuchipudi et al., 2021). Например, показано, что свиньи могут нередко заражаться гриппом птиц H5Nx субтипов (W. Ma et al., 2009). Таким образом, свиньи могут выступать действительно эффективным резервуаром для возникновения новых потенциально пандемических штаммов – примером тому явилось распространение пандемии «свиного гриппа» H1N1 в 2009 году (W. Wu et al., 2004).

Циркуляция вируса гриппа А в популяции людей отмечается ежегодно. Человеческие вирусы гриппа относятся к трем субтипам: А(H1N1), А(H2N2) и А(H3N2). Стоит отметить, что преимущественное активное распространение отдельных субтипов среди людей происходит циклично (D.L. Suarez, 2016).

Таким образом, постоянный надзор за гриппом птиц и свиней играет важнейшую роль раннего обнаружения адаптированных штаммов и преодоления межвидового барьера различных специфических вариантов вируса гриппа. Это позволит на ранней стадии обнаружить потенциального кандидата для будущей пандемии и своевременно принять меры.

1.4.2 Влияние экологических особенностей и путей миграции различных таксонов перелетных птиц на распространение вируса гриппа

Водоплавающие птицы, принадлежащие к семейству *Anatidae* (утки, гуси и лебеди), являются основным резервуаром всех 16 гемагглютининовых и 9 нейраминидазных подтипов вирусов птичьего гриппа (U. Joseph et al., 2017; Р.М. Hansbro et al., 2010). Мигрирующие виды птиц обитают в огромном разнообразии водно-болотных угодий и водных местообитаний, от рек и озер до

открытого океана. Проводимые исследования окольцованных птиц позволяют предположить, что мигрирующие между Индией, Европой и Россией птицы могут выступать переносчиками вируса (J.H. Verhagen et al., 2015). Данные о персистенции AIV в популяциях водоплавающих птиц имеют первостепенное значение для расшифровки эпизоотии этих вирусов в популяциях диких мигрирующих птиц и, следовательно, для прогнозирования и предотвращения вспышек заболеваний (D.E. Stallknecht et al., 1990). Роль птиц семейства *Anatidae* подтверждается многими исследованиями по всему миру. Большинство видов птиц, потенциально вовлеченных в циркуляцию HPAI H5N1 на озере Цинхай - важном месте размножения и остановки водоплавающих птиц вдоль Центральноазиатского пролетного пути — принадлежали к *Anatidae Anseriformes*, на долю которых приходится более 39% от общего числа мигрирующих птиц весной и более 91% осенью (P. Cui et al., 2011).

Исследования, проводимые в период с 2003 по 2012 год, показали, что регулярная передача вируса HPAI H5N1 происходила между перелетными птицами, и миграции птиц коррелировали с пиками вспышками H5N1 HPAI. Это говорит о том, что передача HPAI H5N1 тесно связана с миграцией птиц, что требует расширения сотрудничества между странами, расположенными вдоль одних и тех же пролетных путей (L.J. Chen et al., 2017). Однако крупномасштабный филогеографический анализ показывает, что распределение и обмен штаммов AIV в пределах данного миграционного пути может быть в 4-13 раз больше, чем скорость обмена между пролетными путями, что подразумевает, что миграционные пути играют важную роль в формировании различных географических паттернов AIV. Это подчеркивает важность наблюдения за местообитаниями околотовных птиц в период миграции (M. Fourment et al., 2017). Также важно отметить, что существуют исследования, в которых подчеркивается роль транспортировки и разведения домашней птицы как возможного фактора распространения гриппа птиц, это может быть дополнительным фактором (J.H. van der Kolk, 2019). Тем не менее, миграция диких птиц является решающим фактором переноса AIV на большие расстояния,

что позволяет распространяться новым вирусным штаммам в тех регионах, где обитают популяции птиц без иммунитета к ним.

Существует целый ряд программ по мониторингу AIV, в ходе которых биоматериал от птиц собирается регулярно в течение многих лет. Недавнее пятилетнее исследование на Аляске было сосредоточено на определенных видах, оказывающих серьезное влияние на распространение AIV в регионе, а именно на речных утках (*Anas spp.*), гусях-белошей (*Chen canagica*) и серокрылых чайках (*Larus glaucescens*). Исследование не выявило различий генетическом разнообразии вирусов одинаковых субтипов между различными водоплавающими птицами; однако сами субтипы варьировались между утками и чайками. Интересные результаты секвенирования и биоинформационного анализа показали, что последовательности вирусов, выделенных от шилохвосты (*Anas acuta*), гусей-белошеев и сизокрылых чаек формируют отдельные филогенетические клады, некоторые из которых были близки азиатским вирусам (A.B. Reeves et al., 2018).

Аналогичные долгосрочные исследования были проведены на азиатском континенте теми же исследовательскими группами в Японии (2000-2007 и 2010-2014) и Монголии (2010-2014 и 2017-2019), где отбор проб осуществлялся путем сбора фекалий (T.B. Le et al., 2020; R. Manzoor et al., 2008; A. Ulaankhuu et al., 2020). Дифференциальный анализ между видами хозяев не проводился, но был проведен подробный анализ вирусной последовательности, выявивший в общей сложности 15 вирусов H5 и 25 вирусов гриппа А H7, которые были идентифицированы и охарактеризованы в ходе этих двух исследований.

Антигенный анализ выделенных вирусов показал высокую стабильность антигенности вирусов у диких водных птиц, которая зависела от разнообразия их нуклеотидных последовательностей и отличалась от таковой у HPAIV, выделенных в Азии за тот же период времени (A. Ulaankhuu et al., 2020; T. Hiono et al., 2015). Авторы пришли к выводу, что вирусы HPAIVs и китайского H7N9, ответственные за вспышки птичьего гриппа в Азии в течение периода исследования, не сохранялись преимущественно у перелетных водоплавающих

птиц в Монголии и Северной Японии, за исключением спорадических случаев. Тем не менее, они рекомендуют продолжать мониторинг вирусов гриппа H5 и H7, как у домашних, так и у диких птиц, для борьбы с этим заболеванием.

Другое многолетнее исследование было проведено в Северной Америке в период с 1976 по 2015 год. Образцы были взяты у перелетных водоплавающих птиц на всех миграционных путях Миссисипи и Центральной части в Соединенных Штатах и Канаде. Поскольку отбор проб проводился исключительно путем взятия мазков у пойманных живьем или добытых охотниками птиц, было возможно соотнести вид и выделенный вирусный штамм. AIV были обнаружены в 8427 (0,8%) из 77 969 образцов. В общей сложности было выделено 96 комбинаций подтипов HA/NA, которые включали большинство подтипов HA (от H1 до H14) и все 9 подтипов NA. Примечательно, что на долю речных уток приходилось 91% всех образцов, что подтверждает гипотезу о том, что птицы семейства *Anatidae* являются основным резервуаром и переносчиком болезни. Наблюдались ежегодные тенденции распространения гриппа и его диверсификации. Несколько доминирующих субтипов были обнаружены в северных местах размножения в течение лета, они обладали достоверно более высокой распространенностью. Распространенность этих штаммов постепенно снижалась по мере миграции водоплавающих птиц к южным местам зимовки, наряду с увеличением разнообразия субтипов. Авторы также отмечают, что движущей силой этого явления может быть созревание клеток иммунной системы молодняка водоплавающих птиц в результате взаимодействия с новыми вирусами. Примечательно, что изоляты, полученные зимой, имели самый высокий процент редких комбинаций HA/NA. Кроме того, 70% изолятов AIV H5 и 49% H7 (которые представляют основную опасность для передачи от человека) были получены из образцов, собранных осенью и весной соответственно; это подтипы, которые могут иметь значительные последствия для общественного здравоохранения и сельского хозяйства (E.R. Diskin et al., 2020).

Исследования по изучению реассортантных штаммов AIV позволяет выявлять новые вирусы. Примером является уникальный случай выделения в

2014 году вируса H3N6 от гусей на озере Поян (провинция Цзянси, Китай). Филогенетический анализ показал, что эти штаммы были реассортантами вирусов H3Nu (N3, N6, N8) и H5N6 евразийского происхождения, циркулирующих как среди диких, так и среди домашних птиц. Примечательно, что в новых вирусах H3N6 был обнаружен ген PB1 от вируса H9N2 (R. Li et al., 2020). Другой уникальный пример – первое зарегистрированное выделение штамма H2N9 в Корее (S.J. Yeo et al., 2019). Его филогенетический анализ выявил сложное происхождение разных сегментов как от евразийских, так и от восточноазиатских вирусов.

Новым направлением в вирусологии является сотрудничество с орнитологами, которые занимаются спутниковым отслеживанием мигрирующих водоплавающих птиц. Это важный и дорогостоящий инструмент для оценки роли диких птиц в передаче гриппа птиц на большие расстояния. Альтернативный метод опосредованного изучения, который использует соотношения стабильных изотопов в перьях мигрирующих птиц, показал потенциал в исследовании мигрирующих уток в Азии. Авторы рекомендуют его использовать в сочетании со спутниковым отслеживанием для достижения оптимальной эффективности при меньших затратах (E.S. Bridge et al., 2014).

Анализу гриппа птиц могут помочь современные картографические инструменты, которые могут накладывать на карту различные факторы риска, включая распространение штамма. Существуют различные картографические инструменты с такой возможностью, такие как географические информационные системы (GIS), база данных исследований гриппа (IRD) (R.B. Squires et al., 2012), OpenFlu и EMPRES-i. Сочетание филогенетического анализа вируса и картографирования образцов биоматериала для его выделения выявило связи между эволюционными и географическими особенностями вируса гриппа А (H7N9). На полученном филогенетическом дереве можно было выделить три эпизоотические волны в популяциях домашних кур, которые регистрировались вдоль Восточноазиатско–австралазийского пролета в Китае. GIS позволила идентифицировать потенциальные виды мигрирующих птиц в качестве

кандидатов, ответственных за распространение инфекции H7N9 в различных китайских провинциях, таких как Шанхай, Цзянсу, Чжэцзян, Фуцзянь, Цзянси и Гуандун (B. Shi et al., 2018). На долю этих регионов приходится 91,2% от общего числа зарегистрированных случаев H7N9 у кур в глобальной базе данных по гриппу (GISAID). Мониторинг штамма H7N9 особенно важен, поскольку этот вирус вызывает многочисленные случаи заражения людей в Китае (A. Blagodatski et al., 2021). Основываясь на пространственном распределении идентифицированных видов птиц, специалисты определяют географические горячие точки мониторинга AIV; они наносятся на карту различных регионов (B. Shi et al., 2018).

Подробное исследование, посвященное основным резервуарам вирусов гриппа птиц (утки и чайки), было проведено в Республике Грузия, которая расположена на пересечении трех миграционных путей: Центральноазиатского, Восточно-Африканского/Западноазиатского и Черноморско-Средиземноморского (A. Blagodatski et al., 2021). Такие регионы служат горячими точками для раннего обнаружения новых штаммов AIV. В течение шести лет (с 2010 по 2016 год) были собраны образцы AIV от различных видов уток и чаек, которые размножаются, мигрируют и зимуют в Грузии. Отбор проб в основном осуществлялся путем отлова живых птиц и взятия парных мазков из ротоглотки и клоаки, образцов сыворотки и, в некоторых случаях, образцов перьев. Были выделены двадцать четыре подтипа HA/NA вируса гриппа А, включая 12 различных подтипов HA (H1-H7, H9, H10, H11, H13 и H16) (A. Blagodatski et al., 2021). Ценность этого исследования заключается в точной идентификации вида птицы-хозяина для каждого взятого образца, его пола и возраста. Исследование продемонстрировало значительное разнообразие субтипов вирусов (в первую очередь низкопатогенных). Обнаружено, что представленность в популяции птиц варьировалась из года в год. Также были идентифицированы два штамма HPAI, принадлежащих к кладу 2.3.4.4, H5N5 и H5N8. Авторы пришли к выводу, что распространение вирусов гриппа птиц в экосистеме с несколькими хозяевами неоднородно. Эволюция вирусов гриппа в их естественных биотопах

представляет собой сложную схему взаимодействий экологических факторов. Понимание движущих сил вирусной эволюции является ключом к исследованию возникающих патогенов, интерпретации данных из разных мест по всему миру и, в конечном счете, пониманию риска проникновения возникающих вариантов из одного географического региона в другой (D. Venkatesh et al., 2018; A. Blagodatski et al., 2021).

Сегодня известно также, что зараженные дикие птицы могут выступать в качестве переносчиков на более короткие расстояния. Вероятно, локальное перемещение вируса птицами активно происходило в Европе в начале 2006 года (T.P. Weber et al., 2007). Предполагается, что дикие птицы во время миграции могут передавать вирус вдоль пути полета между особями в течение коротких временных промежутков. Таким образом, этот способ в финале может приводить к передаче на большие расстояния.

В целом, большинство исследований было сосредоточено на водных диких перелетных птицах, поскольку они служат как резервуарами, так и переносчиками птичьего гриппа. Однако, некоторые исследования выявили значительную распространенность AIV и среди птиц, не относящихся к водоплавающим. Недавние сравнительные исследования вирусов гриппа птиц в восточной Мексике показали общую высокую распространенность - 39%. Этот регион является местом пересечения трех основных миграционных путей Северной Америки. Распространенность была особенно высока у наземных птиц (49%) по сравнению с водными птицами (26%), и не было никакой разницы в общей распространенности между оседлыми (39%) и перелетными птицами (39%) (C. Cerda-Armijo et al., 2020). Согласно этому исследованию, резервуарный потенциал неводоплавающих птиц может быть даже выше, чем у водоплавающих, и это необходимо учитывать при проведении мониторинговых исследований.

Основными источниками знаний о возникновении и распространении AIV во времени и пространстве являются долгосрочные мониторинговые исследования (от нескольких лет до десятилетий). Технические методы, такие как геоинформационные системы, спутниковое отслеживание птиц или анализ

изотопов перьев, добавляют дополнительные данные к глобальному мониторингу гриппа птиц. Исходя из данных GISAID можно сделать вывод, что некоторые регионы подвергались и продолжают подвергаться довольно регулярному и точному мониторингу, в том числе Северная Америка, Европа и Юго-Восточная Азия. В России существует достаточно много данных по Сибири. По этой территории с низкой плотностью населения, суровыми климатическими условиями имеется наибольшее количество информации и исследований. Очевидно, что роль Сибири в мониторинге гриппа птиц трудно переоценить – регион имеет ключевое в циклах размножения значение для многих видов водоплавающих птиц не только Азии, но и Европы и Африки. Этот это регион, где летом обитают перелетные водоплавающие птицы и другие птицы из Юго-Восточной Азии и Африки, размножающиеся и перекрестно заражающие друг друга различными штаммами AIV, и где пересекаются многочисленные пути миграции, что приводит к межконтинентальному распространению вируса. Это может быть подтверждено тем фактом, что штамм H5N8 HPAI, сочетающий сегменты разных регионов, был обнаружен в Тыве, расположенной на юге Сибири вдоль Центральноазиатского пролета, в 2016 году. Вирус был обнаружен у нескольких видов водоплавающих птиц: шести черноголовых чаек (*Larus ridibundus*), четырех серых цапель (*Ardea cinerea*), четырех больших бакланов (*Phalacrocorax carbo*), одной большеголовой поганки (*Podiceps cristatus*), одной обыкновенной крачки (*Sterna hirundo*) и одной утки (семейство *Anatidae*; вид не идентифицирован) (L. Sims et al., 2016); присутствие штамма HPAI в этом районе демонстрирует, что Сибирь является важным местом для мониторинга. Тем ценнее следует оценивать уникальное ключевое место мониторинга в Каспийском регионе. Следует поощрять долгосрочные полевые исследования AIV у мигрирующих птиц в регионах, которые практически не контролируются, чтобы повысить осведомленность о глобальной ситуации (A. Blagodatski et al., 2021).

1.4.3 Высокпатогенный вирус гриппа H5N1 и H5NX у диких птиц

По сравнению со всеми другими вспышками вируса HPAI, нынешняя эпизоотия вируса HPAI H5N1 во многих отношениях весьма необычна. Вирус HPAI H5N1 считается эндемичным во многих странах Азии, Ближнего Востока и Африки, что приводит к регулярным вспышкам заболевания домашней птицы и случайной зоонозной передаче людям и другим млекопитающим, постоянному изменению генотипов и обратному распространению вируса среди диких птиц, что приводит к вспышкам и циркуляции вируса в этих птицах.

Известно, что вирус HPAI H5N1 произошел от вируса, циркулирующего среди домашних птиц в провинции Гуандун, Китай, в 1996 году и широко распространившегося на птицеводческих рынках Гонконга в 1997 году (Н. Chen et al., 2004). Ранее считавшаяся маловероятной прямая передача чисто птичьего вируса людям во время вспышки в Гонконге в 1997 году означала смену парадигмы (J.C. de Jong et al., 1997). После локализации вспышки вируса HPAI H5N1 вирус вновь появился в 2002 году, вызвав вспышку среди водоплавающих птиц и различных других видов птиц в двух парках Гонконга (Т.М. Ellis et al., 2004; К.М. Sturm-Ramirez et al., 2004). В 2003 году вирус HPAI H5N1 снова был передан людям, что привело по меньшей мере к одному смертельному случаю. Имеется мало информации о циркуляции вируса HPAI H5N1 в 1997-2002 годах, хотя считается, что в течение этого периода он непрерывно циркулировал в Китае (Н. Tian et al., 2015). Вирус HPAI H5N1 вновь возник в 2003-2004 годах и распространился по большей части Юго-Восточной Азии, включая Камбоджу, Китай, Гонконг, Индонезию, Японию, Лаос, Малайзию, Южную Корею, Таиланд и Вьетнам.

До 2005 года вирусы HPAI H5N1 выделялись у диких птиц лишь эпизодически, но в апреле-июне 2005 года произошла первая зарегистрированная вспышка среди диких перелетных птиц на озере Цинхай, Китай. Эта вспышка вируса HPAI H5N1 затронула большое количество диких птиц, таких как горные гуси (*Anser indicus*), буроголовые чайки (*Larus brunnicephalus*), большие черноголовые чайки (*Larus ichthyaetus*) и большие бакланы (*Phalacrocorax carbo*)

(J. Liu et al., 2005). После вспышки вируса HPAI H5N1 у диких птиц в 2005 году вирус быстро распространился на запад по Азии, Европе, Ближнему Востоку и Африке, из-за перемещения домашней птицы и продуктов птицеводства или через диких перелетных птиц (M. Gilbert et al., 2006). Роль диких перелетных птиц в распространении HPAI H5N1 является спорной, поскольку инфицированные птицы могут быть слишком сильно поражены, чтобы продолжать миграцию (C.J. Feare et al., 2006). Однако было показано, что патогенез инфекции, вызванной вирусом HPAI H5N1, и восприимчивость диких видов птиц к этой инфекции значительно различаются в зависимости от вида птиц и предыдущего контакта с вирусами гриппа. Изучение экспериментальных инфекций показывает, что предварительное воздействие вирусов LPAI гомологичных или гетерологичных подтипов может привести к частичному иммунитету к вирусной инфекции HPAI H5N1 (S.R. Fereidouni et al., 2009). Такой ранее существовавший иммунитет может не предотвращать репликацию вируса, но может защитить птиц от развития тяжелых заболеваний, тем самым позволяя им продолжать мигрировать и потенциально распространять вирус среди других птиц на больших географических территориях. При экспериментальном заражении вирусом HPAI H5N1 было обнаружено, что у некоторых видов уток развиваются либо незначительные признаки заболевания, либо его отсутствие, при этом вирус все еще выделяется преимущественно из дыхательных путей, в то время как у других видов развивается в значительной степени смертельная инфекция, которая не позволяет им эффективно распространять вирус на значительное расстояние (J.M. Brand et al., 2018). В результате этого частота инфекций, вызванных вирусом HPAI H5N1, у диких видов птиц варьируется от высокой заболеваемости и смертности (гуси, лебеди и некоторые виды уток) до минимальной заболеваемости без смертности (виды речных уток). Таким образом, хотя распространение HPAI H5N1 в нескольких частях Азии, вероятно, было вызвано перемещением домашней птицы и продуктов птицеводства (D.J. Alexander et al., 2000; L.D. Sims et al., 2003; M. Gilbert et al., 2006), проникновение в Европу, вероятно, было вызвано перелетными птицами (E. Starick et al., 2008; Y. Si et al.,

2009) особенно поскольку в пострадавших регионах не сообщалось о вспышках среди домашней птицы (A. Globig et al., 2009; U. Hesterberg et al., 2009). Хотя случаи гибели лебедей были первым показателем наличия вируса НРАІ H5N1 в нескольких европейских вспышках, это не обязательно указывает на то, что этот вид является основным переносчиком, но вместо этого они могли быть птицами сигнальных популяций, зараженными другими мигрирующими видами птиц.

Хотя вирусы НРАІ H5N1 постепенно распространились по регионам Азии, Европы, Ближнего Востока и Африки в течение 2000-х годов, наиболее резкое и быстрое появление вирусов НРАІ наблюдалось в начале 2010-х годов, когда реассортантные вирусы НРАІ H5N8 распространились из Азии в Европу и Северную Америку менее чем за 12 месяцев. Реассортантные вирусы гриппа H5N8 содержали НА, который был очень похож на НРАІ вирусов H5N1 (из клады 2.3.4.4), и начал вызывать падеж у домашней птицы в Южной Корее в начале 2014 года (Y.J. Lee et al., 2014). Считалось, что вирус был занесен в летние места размножения в западной стороне Берингова пролива, на территории это представляет собой сближение ряда путей миграции диких птиц. Совпав с осенней миграцией птиц из России, вирус затем распространился на запад в Европу, что привело к вспышкам заболевания домашней птицы в Нидерландах, Германии, Соединенном Королевстве и Италии, а также на восток в Северную Америку (D.H. Lee et al., 2015).

В Северной Америке вирус НРАІ H5N8 дополнительно реассортировался с местными вирусами LPAI, в результате чего был получен новый реассортант НРАІ H5N2, который содержал пять сегментов РНК от H5N8 и три от североамериканских вирусов LPAI (J. Pasick et al., 2015). Вирус H5N2 впоследствии вызвал значительное число вспышек заболевания домашней птицы по всему среднезападному региону Соединенных Штатов в 2015 году (D.R. Karpczynski et al., 2015). Кроме того, вирусы H5N1, содержащие четыре сегмента РНК вируса H5N8 и четыре из североамериканских вирусов LPAI, также были обнаружены у внешне здоровой утки в Соединенных Штатах в течение 2015 года. Причины, по которым реассортантные вирусы НРАІ H5NX появились и распространились так быстро по

сравнению с H5N1, неясны, но могут связаны с различием в патогенности, вызываемой вирусами у ключевых видов перелетных птиц (H.M. Kang et al., 2014). Помимо вируса H5N6 в Китае, ни один из других новых вирусов клада 2.3.4.4 H5NX не вызывал заражения людей (O.G. Pyankova et al., 2021).

На сегодняшний день наблюдается панзоотия вируса гриппа H5N1, H5N8 субтипов (Z. Valley-Omar et al., 2020). С 2020 года вспышки высокопатогенных вирусов птичьего гриппа (HPAI), в частности H5N1 и H5N8, происходят в глобальном масштабе, поражая диких птиц, птицефабрик и млекопитающих на многих континентах. Эта продолжающаяся панзоотия считается одной из наиболее значительных с точки зрения географического распространения, количества затронутых видов и экономических потерь. Вирус H5N1 классифицируется как принадлежащий кладе 2.3.4.4b, которая продемонстрировала генетическую диверсификацию и способность инфицировать более широкий спектр видов, включая млекопитающих. Реассортация вирусов H5N8 2.3.4.4b с другими штаммами в 2020 году привела к появлению нового штамма H5N1, который с тех пор распространился по Европе, Африке и Азии. Панзоотия затрагивает большее число видов (более 48 видов млекопитающих, зарегистрированных в 26 странах) по сравнению с предыдущими волнами заражения H5N1 (P. Chang et al., 2023). Потенциальные источники инфекции включают тесный контакт с инфицированными птицами, проглатывание инфицированных птиц и возможную передачу от млекопитающего к млекопитающему в некоторых случаях. Мутации, обнаруженные в некоторых исследованиях, позволяют предположить, что вирус может адаптироваться для более эффективного заражения млекопитающих. Панзоотия вызвала значительные вспышки среди широкого спектра видов, включая многие виды, вызывающие озабоченность по поводу сохранения (A.J. Rodriguez-Morales et al., 2021). Побочные явления иногда приводят к заражению людей, хотя передача инфекции от человека к человеку остается ограниченной. Высокая летальность, присутствие по всему миру, разнообразие носителей и продолжающиеся мутации делают вирус H5N1 самой серьезной угрозой пандемии в мире.

Постоянный эпиднадзор необходим для мониторинга эволюции вируса и снижения риска глобальной пандемии. Таким образом, продолжающаяся панзоотия H5N1 и H5N8 представляет собой серьезную проблему для глобального здравоохранения из-за ее беспрецедентных масштабов, способности вируса инфицировать широкий спектр видов и его способности адаптироваться и распространяться среди млекопитающих. Постоянные усилия по наблюдению и обеспечению готовности имеют решающее значение для борьбы с этой растущей угрозой.

1.4.4 Другие зоонозные вирусы гриппа птиц

Вирусные инфекции гриппа являются причиной повторяющихся ежегодных эпидемий и порядка 250 000-500 000 смертей во всем мире. Повторяющиеся сезонные эпидемии возникают из-за того, что вирус гриппа очень быстро накапливает точечные мутации в генах HA и NA во время циркуляции, процесс, известный как “антигенный дрейф”, который позволяет вирусу ускользать от иммунитета хозяина. Сезонное заражение вирусами гриппа позволяет иммунной системе вырабатывать антитела против HA и NA, тем самым обеспечивая человеческой популяции уровень защитного иммунитета против подобных штаммов. Ситуация стала гораздо серьезнее с появлением вирусов с новыми подтипами HA или NA, которые ранее не циркулировали в человеческой популяции. Эти вирусы представляют серьезную пандемическую угрозу, поскольку популяционный иммунитет к ним отсутствует, поэтому заражение людей часто связано с высоким уровнем заболеваемости. Подтипы гриппа H1, H2 и H3 циркулируют в человеческой популяции уже более ста лет, поэтому население в целом обладает некоторым предварительным иммунитетом против сезонных штаммов этих подтипов. С другой стороны, вирусы птичьего гриппа, такие как ранее упомянутый H5, а также H6, H7, H9 и H10, имеют на своей поверхности новые HA, которые будут в значительной степени чужеродны иммунной системе большей части человеческой популяции.

В июне 2013 года был зарегистрирован первый случай заражения человека птичьим вирусом H6N1 в Тайване -летней девушки. Примечательно, что у вируса была замена G228S в белке гемагглютинаина, которая может увеличить его сродство к человеческому рецептору сиаловой кислоты, связанному с $\alpha 2-6$ (R.P. Vries et al., 2017).

В марте 2013 года в Китае впервые были зарегистрированы случаи инфицирования людей низкопатогенным вирусом AIV (LPAIV) H7N9. С тех пор вирус продолжает распространяться в Китае, вызвав пять волн инфицирования людей (1-5). По состоянию на 25 июля 2017 года в 24 провинциях было подтверждено 1557 случаев заболевания людей и 605 смертельных исходов, причем резкое увеличение числа случаев произошло в конце 2016 года и начале 2017 года (W. Qi et al., 2013).

Также существует опасение, что даже птичий вирус H3N8 может быть зоонозным – в 2022 году он вызвал острый респираторный дистресс-синдром у 4-х летнего мальчика в провинции Хэнань (Китай) (D. Cheng et al., 2022).

Следовательно, уязвимость человека к новым штаммам зоонозного птичьего гриппа, таким как H7N9 (рисунок 5) или H10 (рисунок 6), может быть очень вероятной, приводя к глобальной угрозе (L. Qi et al., 2014).

В связи с этим важное значение имеет обнаружение во время стандартного мониторинга вирусов гриппа птиц с зоонозным потенциалом, штаммов, которые представляют растущую угрозу здоровью человека.

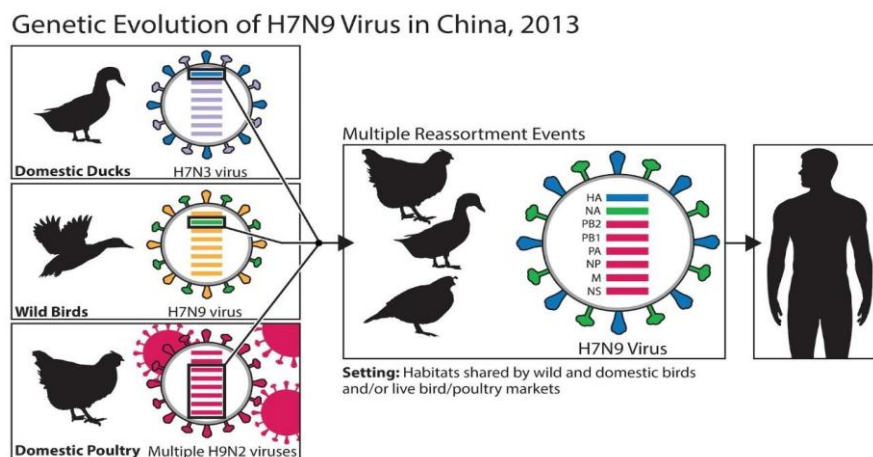


Рисунок 5 – Зоонозная передача гриппа H7N9 от птиц к человеку: потенциальный пандемический путь (CDC, 2013)

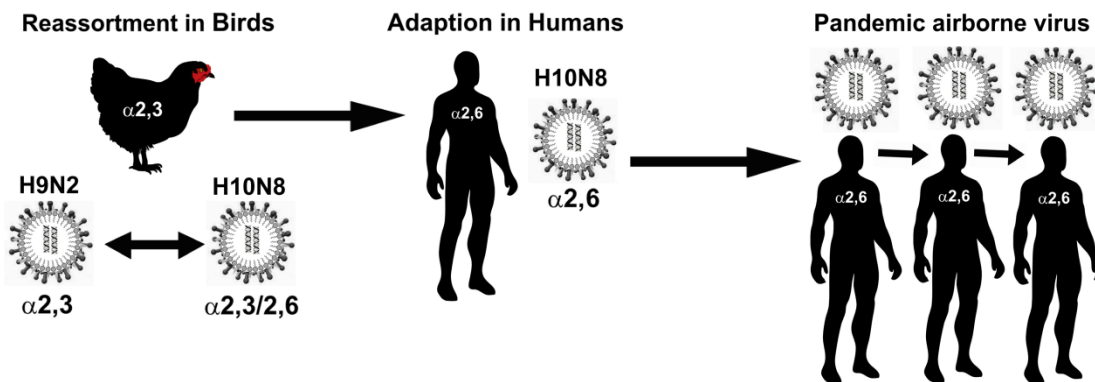


Рисунок 6 – Зоонозная передача гриппа H10 от птиц к человеку: потенциальный пандемический путь (E. K. Schneider et al., 2017)

1.5 Характеристика орнитофауны и водных угодий западного побережья Среднего Каспия

Пролетные пути для определенных групп птиц включают относительно узкие, четко определенные маршруты, отражающие их экологические требования. Например, водоплавающим птицам требуется доступ к прибрежным и/или внутренние водно-болотные угодья, в то время как перелетные парящие птицы, такие как крупные хищные птицы, полагаются на тепло и восходящие сквозняки и поэтому избегают пересечения больших пространств открытой воды и высоких горных хребтов (Т. Mundkur et al., 2014).

На территории западного побережья Среднего Каспия преобладает восточноазиатский-африканский пролетный путь, так как значительное количество диких птиц мигрирует из северной части Евразии вдоль западного побережья Среднего Каспия (Е.В. Вилков, 2006). Трассы пролета европейских и азиатских мигрантов пересекаются на территории кавказского миграционного коридора, так называемого «бутылочного горлышка» и распределяются вдоль всего западного побережья (рисунки 7, 8).

При анализе территории западного побережья Среднего Каспия и примыкающих районов Чеченской Республики и Калмыкии было выделено около 20 наиболее значимых и хорошо изученных водно-болотных угодья. Эти территории являются гнездовыми ареалами, местами отдыха во время перелета и зимовки большого числа видов. Для исследования были выбраны угодья, в



Рисунок 7 – Схема расположения кавказского миграционного коридора - «бутылочного горлышка» и трасс предполагаемого пролета европейский и азиатских мигрантов (Е.В. Вилков, 2019)

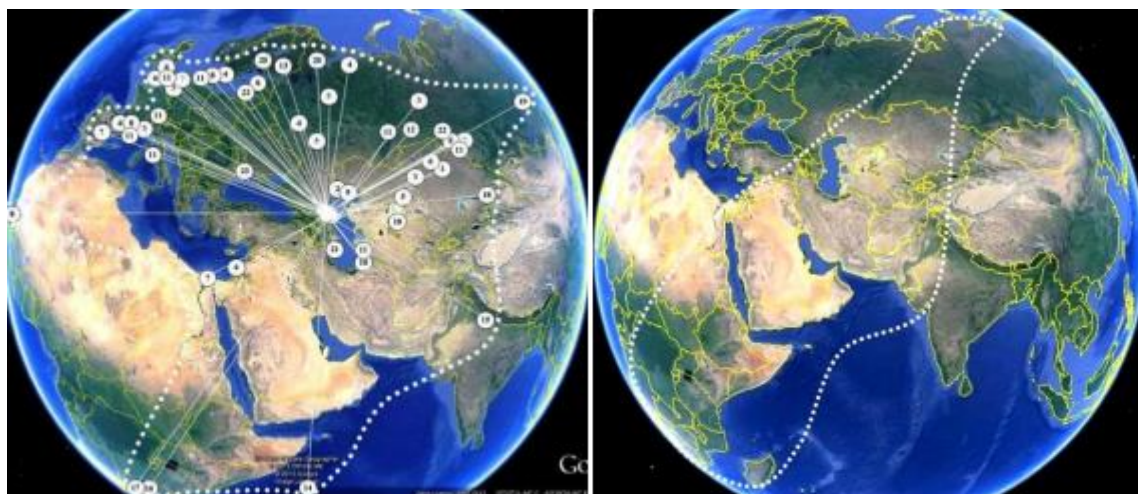


Рисунок 8 – Западносибирско-восточноафриканский миграционный ареал и Схема реконструкции трафика пролета мигрирующих птиц, составленная по данным Центра кольцевания птиц России ИПЭЭ РАН (G. M. Copenello Et al., 2007). Использовано 23 таксона: 1) серый гусь; 2) лебедь-шипун; 3) кряква; 4) чирок-свистунок; 5) серая утка; 6) свиязь; 7) шилохвость; 8) чирок-трескунок; 9) широконоска; 10) красноносый нырок; 11) красноголовая чернеть; 12) гоголь; 13) скопа; 14) камнешарка; 15) ходулочник; 16) краснозобик; 17) песчанка; 18) черноголовый хохотун; 19) малая чайка; 20) клуша; 21) хохотунья; 22) сизая чайка; 23) морской голубок (Е. В. Вилков, 2017)

которых зарегистрировано 262 вида птиц (из которых 115 видов являются гнездящимися оседлыми): озеро Аджи (Папас); озеро Южный Аграхан; Аграханский залив и дельта реки Терек (Северный Аграхан); Ачикольская система озер (В.Г. Кривенко, 2000).

Озеро Аджи (Папас) (рисунок 9) находится в Каякентском районе Республики Дагестан, в южной части дагестанского побережья Каспийского моря (в 14 км от берега). В целом, оно является лагунным озером средней глубины, вокруг которого описано небольшое количество неглубоких и временных разливов, которые тянутся вдоль берега Каспийского моря. Глубина озера в среднем составляет 1,6 м., при максимальной ширине 1,5 км и длине 5 км.



Рисунок 9 – Озеро Аджи (Папас) (Водно-болотные угодья России, 2024)

Полоса зарастания тростником в прибрежных участках достигает 200 м. Кормовая баз для водных и околоводных птиц обильна; озеро зарастает подводной растительностью. Озеро представляет собой ключевую орнитологическую точку, важную для остановок в периоды миграции, а также служит зимовочным ареалом для многих видов. Очевидна ценность данного водно-болотного угодья на западном побережье Каспия для мигрирующих птиц, а

также значительного количества редких и исчезающих видов (М.М. Расулова и др., 2011).

Основа орнитофауны озера Аджи во все сезоны представлена водоплавающими птицами. Самым многочисленным гнездящимся видом среди семейства поганковых является чомга, с максимальной численностью до двухсот пар.

Среди представителей семейства утиных наибольшую численность имеет красноносый нырок (до 150 пар). Среди семейства пастушковых – лысуха, численность которой достигает 120 пар. Среди гнездящихся птиц также отмечены следующие виды: черношейная поганка, серая и рыжая цапли, малая выпь, огарь, пеганка, серая утка, кряква, чирок-трескунок и такие представители как белоглазый нырок, камышница, травник, чибис, ходулочник и речная крачка.

Наиболее редко представлены такие виды водных и околоводных птиц, как: малая поганка, большая выпь, серая, малая и большая белые цапли, лебедь-шипун, савка, султанка, водяной пастушок, погоныш-крошка, перевозчик, шилоклювка и малая крачка.

В летний сезон также отмечены следующие виды, с вероятностью гнездования: фифи, поручейник, большой кроншнеп, большой веретенник, черноголовый хохотун, озерная и малая чайки, белокрылая крачка.

Видовой состав орнитокомплекса озера значительно увеличивается в период миграции, из-за пролета и остановок цапель, бакланов, розовых фламинго, кудрявого пеликана, гусей, речных и нырковых уток, чаек, куликов и крачек. На территории угодья зарегистрировано более 30 видов птиц, внесенных в Красную книгу.

Южный Аграхан (рисунок 10) является самым крупным озером в Республике Дагестан. Согласно гипотезе, оно сформировалось при отделении ранее существовавшего лимана в районе исчезающего Аграханского залива. Озеро расположено в Бабаюртовской районе, в приморской зоне к югу от низовьев реки Терек. В общей сложности площадь составляет более 15 тыс. га, при средней глубине озера около двух метров. Это угодье является уникальной

водно-болотной экосистемой и является местообитанием убежище большого количества краснокнижных видов. В период миграций на озере отмечено более 20 тыс. особей водоплавающих и околоводных птиц (М.Д. Гаджиев и др., 2013).

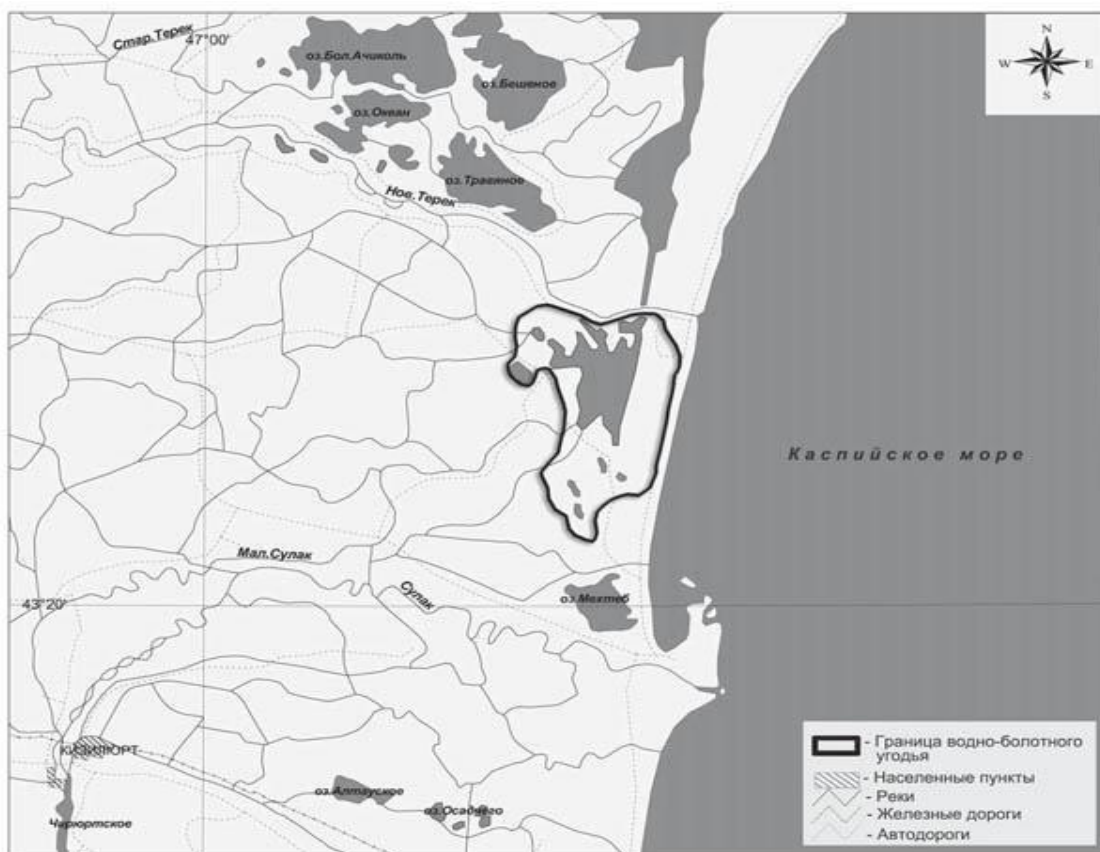


Рисунок 10 – Озеро Южный Аграхан (Водно-болотные угодья России, 2024)

К гнездящимся видам данного угодья относятся разные виды птиц, такие как: кудрявый пеликан, серый гусь, пеганка, малый баклан, красноносый нырок, каравайка, лысуха, хохотунья, белокрылая крачка, чибис. Летом были отмечены также большие кроншнепы, большие веретенники, черноголовые хохотуны, авдотки.

Ачикольская система озер (рисунок 11) находится в центре дельты Терека и связана с территориями ранее существовавших рыбопромышленных комплексов (Аракумский и Нижнетерский). Это неглубокие искусственные водоемы глубиной не более полутора метров, которые в данное время обмелели и сильно заросли тростниками, а побережье покрылось кустарниками.

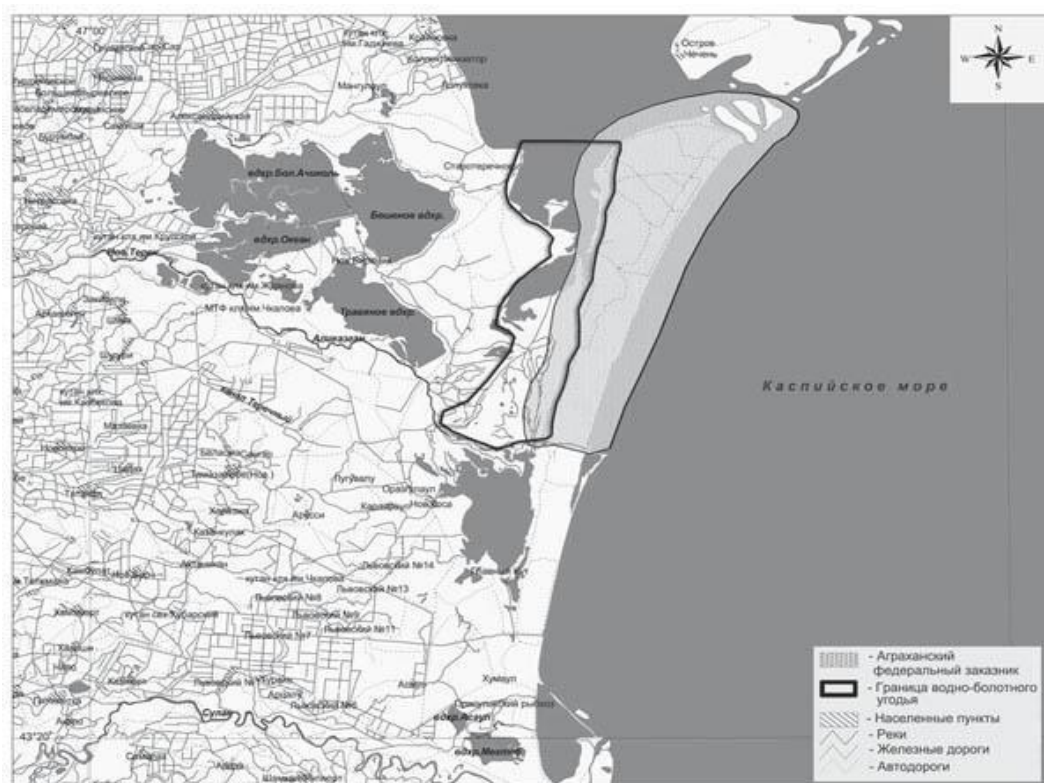


Рисунок 12 – Озеро Северный Аграхан (Водно-болотные угодия России, 2024)

Анализ литературы выявил принадлежность видов птиц, встречающихся на данных территориях, к основным природными хозяевам вируса гриппа А.

Таким образом, важным аспектом является изучение экологии и миграций этих видов, что позволит более точно выявлять пути распространения AIV не только на территории западного побережья Среднего Каспия, но и на Евразийском континенте в целом. В связи с широким ареалом обитания водно-болотных птиц, наиболее актуальны мониторинговые исследования, проводимые в местах массовых скоплений особей из различных географических регионов. Для изучения путей распространения и циркуляции ВГА в популяциях диких птиц важным является изучение таксономической и экологической гетерогенности видов на территории западного побережья Среднего Каспия (Д.В. Магрицкий и др., 2022). Настоящая работа направлена на изучение современного разнообразия вариантов вируса гриппа А, встречающихся на территории западного побережья Среднего Каспия, а также на изучение некоторых биологических свойств, полученных изолятов.

1.6 Заключение по обзору литературы

В результате анализа данных, изложенных в разделах обзора литературы следует, что AIV является опасной вирусной инфекцией, представляющей значительную угрозу для различных видов животных, птиц и человека, и также, наносящей существенный ущерб общественному здравоохранению и экономике стран во всем мире. Согласно литературным данным, дикие птицы водно-болотных угодий играют основную роль в сохранении и распространении AIV. Высокая изменчивость AIV и постоянная его циркуляция в популяциях диких птиц, особенно во время их массового скопления (гнездование, зимовки и т.п), приводит к появлению новых субтипов вируса, что актуализирует процесс постоянного мониторинга.

Преодоление межвидового барьера и высокая скорость изменчивости генома может в свою очередь привести к появлению новых высоковирулентных штаммов вируса для людей, таких как H5N1. Пандемия гриппа H5N1/H5N8 продолжается по всему миру. Наибольшая активность отмечена в Европейском регионе за последние 5 лет.

Особенно важно отметить, что Каспийский регион представляет собой ключевую территорию на границе Европы и Азии с точки зрения биологии целого ряда мигрирующих птиц. На данной территории сходятся и пересекаются трассы пролета Европейских и Азиатских мигрантов. Предыдущие исследования, проведенные в Каспийском регионе, выявили циркуляцию различных вирусов гриппа А, например, у водоплавающих птиц на южном побережье Каспийского моря в Иране или в соседней Грузии (D. Venkatesh et al., 2018).

Также в данном регионе были отмечены вспышки высокопатогенного гриппа у диких птиц различных видов. Первая вспышка HPAIV и массовая гибель почти 500 лебедей-шипунцов произошла в 2005 году (Д.К. Львов и др., 2006), а самая последняя - в 2022 году более 30 000 чаек, крачек и пеликанов (I.A. Sobolev et al., 2023).

Данные по генетическому разнообразию в данном регионе крайне ограничены, что делает данный район стратегически важным для предотвращения

возникновения и распространения НРАІ в случае его возникновения. Настоящее исследование – это первый регулярный мониторинг вируса гриппа А в популяциях диких птиц на ключевых территориях западного побережья Среднего Каспия. Это позволило, в том числе, впервые обнаружить реассортантные штаммы вируса гриппа А у диких птиц содержащие сегменты европейских и среднеазиатских вариантов; а также сегменты высокопатогенных вирусов гриппа.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИСЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Настоящее исследование было одобрено Комитетом по биомедицинской этике Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск (протоколы № 2013-23 и 2021-10). Образцы от птиц были собраны во время официального охотничьего сезона по лицензии региональных министерств экологии и природных ресурсов в рамках ежегодного сбора биологического материала (Программа изучения инфекционных заболеваний диких животных, ФИЦ ФТМ, Новосибирск). Экспериментальная часть работ выполнялась в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины». В исследовании использовались условия уровня биобезопасности по работе с III группой патогенности ФИЦ ФТМ.

2.1.1 Отлов и определение видового состава диких птиц

Сбор материала проходил на территории водно-болотных угодий озера Аджи (Папас), озера Южный Аграхан, Аграханского залива и дельты реки Терек, Ачикольской системы озер районов Республики Дагестан, в местах наибольшей плотности популяций птиц. Отлов производился с использованием орнитологических паутинных сетей. Для осуществления отлова были получены разрешения на осуществление добычи объектов животного мира в Территориальном Управлении Россельхознадзора. Отстрел проводился охотниками в сезон охоты в соответствии с законодательством РФ. Установление видовой принадлежности птиц осуществлялось при помощи определителей птиц с привлечением профессиональных орнитологов Института систематики и экологии животных СО РАН и Института экологии и устойчивого развития Дагестанского государственного университета.

2.1.2 Сбор и хранение клоакальных мазков птиц

Известно, что вирус птичьего гриппа поражает и размножается главным образом в дыхательных и пищеварительных трактах (A. Barberis et al., 2020). Таким образом, типичными способами получения образцов биологического материала, содержащего вирус, от диких перелетных птиц являются мазки из глотки, мазки из клоаки, взятые у живых или только что убитых птиц, и сбор свежих птичьих экскрементов. Кроме того, высокопатогенный AIV также может быть обнаружен во многих органах у тяжело больных или умерших птиц (A. Blagodatski et al., 2021). Отбор проб фекалий позволяет свести к минимуму ущерб популяции птиц и обладает гораздо большей производительностью, чем другие методы, поскольку сбор фекалий требует гораздо меньших затрат времени и разрешений, чем взятие мазка. Кроме того, сбор помета менее громоздок и не требует разрешений, необходимых для отлова или охоты на птиц (E. Videvall et al., 2018). Тем не менее, вероятность выделения жизнеспособного образца AIV из фекального биоматериала, как правило, ниже, чем из свежесобранных мазков из трахеи и даже клоаки, поэтому при отборе проб птичьих фекалий особое внимание необходимо уделять их качеству, чтобы максимально повысить эффективность выделения живого вирусного штамма (S. Ruiz et al., 2021).

Клоакальные мазки отбирались стерильными ватными тампонами и помещались в пробирки с транспортной средой. Номер присваивался каждой пробирке и фиксировался в полевом журнале. Каждый мазок помещался в отдельную пробирку.

Хранение проб до проведения анализа осуществлялось в жидком азоте или в низкотемпературной морозильной камере при температуре не выше -70°C (В.А. Козлова и др., 2020).

Транспортную среду для мазков готовили в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» в стерильных условиях, руководствуясь рекомендованной методике ВОЗ (WHO, 2011). Стерильный фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 ,

1.5 mM KH_2PO_4 , pH=7.2) смешивали со стерильным глицерином в соотношении объемов 1:1. К среде добавляли антибиотики: пенициллин, стрептомицин, гентамицин и нистатин до конечных концентраций 2×10^6 ед/л, 0,20 г/л, 0,25 г и $0,5 \times 10^6$ ед/л соответственно. В стерильные пластиковые пробирки с закручивающимися крышками объемом 2 мл разливали подготовленную транспортную среду по 1 мл. Пробирки со средой хранили при $+4^\circ\text{C}$ или при комнатной температуре не более 48 часов.

2.1.3 Выделение и культивирование вирусов в системе РКЭ

Выделение изолятов вируса гриппа А осуществляли при помощи развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) по рекомендованной методике (WHO, 2011) (рисунок 13).

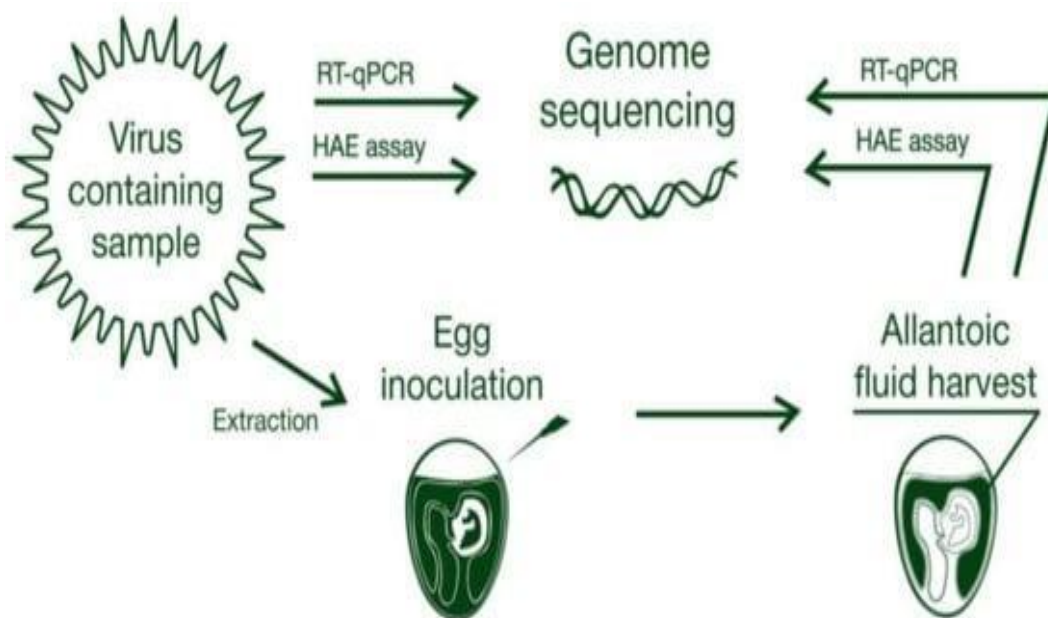


Рисунок 13 – Стандартный протокол для анализа полевых образцов AIV
(A. Blagodatski et al., 2021)

Куриные эмбрионы поставлялись ФГУП «Племенной птицеводческий завод «Новосибирский». Пробирку с клоакальным мазком размораживали. Содержимое размороженной пробирки перемешивали при помощи шейкера, а затем центрифугировали в течение 3 минут при скорости 3000 об/мин для осаждения крупных частиц и бактерий. 100 мкл супернатанта, содержащего биологический

материал, отбирали из пробирки и инокулировали в аллантоисную полость инкубированного в течение 9-ти дней эмбриона. Каждый образец вносили в аллантоисную полость трех РКЭ. Зараженные куриные эмбрионы возвращали в инкубатор и инкубировались в течение 3 суток при температуре 37°C. Далее, в стерильных условиях вскрывалась скорлупа куриных эмбрионов в месте воздушной камеры, аллантоисная жидкость (а.ж.) отбиралась от трех эмбрионов, зараженных одним образцом, в одну пробирку. Образцы аллантоисной жидкости далее проверяли на гемагглютинирующую активность (РГА) с помощью реакции гемагглютинации. По результатам РГА положительные образцы направлялись на тестирование на наличие вируса гриппа А серологическими и молекулярно-биологическими методами. Образцы аллантоисной жидкости с отрицательным результатом РГА отправляли на 2й пассаж в РКЭ, используя для заражения те же объемы, что и в случае заражения супернатантом. В случае повторного отрицательного результата, делали последний 3й пассаж. В случае отсутствия гемагглютинирующей активности аллантоисной жидкости после 3го пассажа заключали, что в исследуемом образце АIV отсутствовал. Аллантоисную жидкость, содержащую вирусы, хранили при температуре -70°C.

2.1.3.1 Ростовые свойства в системе РКЭ

Для каждого штамма был получен пул вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Для этого готовили десятикратные разведения вирусосодержащего материала (1-10) на стерильном физиологическом растворе. Для каждого разведения использовали 10 РКЭ. Вирусосодержащую аллантоисную жидкость одинакового разведения собирали в общий пул, который затем оценивали по продукции НА в РГА и 50% инфекционному титру на РКЭ. Для хранения выбирали пулы с наибольшими показателями. Продукцию НА оценивали в РГА, как описано ниже (см. глава 2.5). Инфекционный титр стока (EID₅₀/мл) вычисляли по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева (И.П. Ашмарин и др., 1962).

2.1.4 Проведение РГА и РТГА

Выявление гемагглютинирующей активности образцов проводилось с помощью реакции гемагглютинации (РГА) по общепринятому протоколу (ВОАН, 2018). Для проведения реакции использовались эритроциты петуха. Для подготовки эритроцитов, кровь с гепарином центрифугировали в течение 3 минут при 3000 об/мин. Удаляли супернатант с осадком лейкоцитов, оставляя нижний слой – эритроциты. Эритроциты промывали фосфатно-солевым буфером, ресуспендируя осадок при помощи шейкера, а затем снова центрифугируя 3 минуты при 3000 об/мин. Повторяли промывание эритроцитов трижды. Разводили фосфатно-солевым буфером осадок эритроцитов до конечной концентрации 0,5%.

Суспензию эритроцитов маркировали, указывая дату заготовки, и хранили при температуре 4°C. В серологическом планшете с U-образными лунками (96 лунок) готовили последовательные двукратные разведения а.ж. в фосфатно-солевом буфере. 50 мкл 0,5% суспензии эритроцитов вносили в каждую лунку и инкубировали 60 минут при температуре 4°C, для предотвращения активации нейраминидазы, чтобы избежать ложноотрицательных результатов. При равномерной седиментации осадка эритроцитов на дне лунки реакцию гемагглютинации считали положительной. Конечной точкой титрования считали наибольшее разведение а.ж., где происходила гемагглютинация. Количество ВГА в конечной точке титрования принимали за одну гемагглютинирующую единицу (ГАЕ). Для постановки реакции торможения гемагглютинации (РТГА) руководствовались протоколом ВОЗ (WHO, 2011). РТГА проводили с а.ж., разведенной до 8 ГАЕ в 50 мкл.

Для постановки реакции использовали 10 mM фосфатно-солевой буфер (pH=7.2). Готовили в 96-луночном планшете серию двукратных разведений типизирующих сывороток в фосфатно-солевом буфере (от 1:10 до 1:1280) в объеме 25 мкл. Для этого во все лунки вносили по 25 мкл ФСБ, в первый ряд вносили дополнительно 25 мкл типизирующих сывороток и титровали мультиканальной пипеткой. 8 лунок отводилось для контроля антигенов и контроля эритроцитов. К

каждому разведению сыворотки добавляли по 25 мкл антигена, содержащего 4ГАЕ. При комнатной температуре инкубировали планшеты в течение 30 минут. После инкубации вносили по 50 мкл суспензии эритроцитов и инкубировали при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа.

2.1.5 Культивирование и титрование вируса на культуре клеток

Выделение вируса гриппа из клинических образцов производили в культуре клеток MDCK. Для этого рассеивали культуру клеток в культуральные флаконы с площадью поверхности $12,5\text{ см}^2$ в концентрации 2×10^5 клеток/мл. В качестве ростовой среды использовали питательную среду для культур клеток Игла-МЕМ с добавлением 10% фетальной сыворотки коров и раствора гентамицина сульфата в концентрации 50 мкг/мл. Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C в течение суток.

Пробирки с образцами центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут. Затем отбирали надосадочную жидкость, которую использовали для заражения клеток. В случае работы с секционным материалом из полученного образца готовили гомогенат, растерев фрагменты ткани со стерильным стеклянным песком в фарфоровой ступке, после чего разводили раствором Хенкса до получения 10%-й суспензии. Полученную суспензию центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин, отбирали надосадочную жидкость, которую использовали для заражения клеток.

Флаконы с суточным монослоем клеток MDCK дважды отмывали раствором Хенкса, после чего исследуемые образцы (по 200 мкл) наносили на монослой клеток. Инфицированные культуры помещали в CO_2 -инкубатор с температурой 37°C и подачей 5% CO_2 на 30 - 40 мин (для адсорбции вируса), после чего в них вносили поддерживающую среду, которую готовили следующим образом: в питательную среду для культур клеток Игла-МЕМ добавляли 0,2% бычьего сывороточного альбумина V фракции, трипсин ТРСК 2 мкг/мл, гентамицина сульфат 50 мкг/мл, амфотерицин В 2,5 мкг/мл. Затем культуральные флаконы помещали в CO_2 -инкубатор с температурой 37°C и подачей 5% CO_2 .

Ежедневно контролировали под микроскопом состояние монослоя с целью обнаружения признаков цитопатического действия вируса (ЦПД), проявляющегося в разрушении монослоя. При отсутствии выраженного ЦПД пробы выдерживали до 7 сут. При отрицательном результате проводили последовательно 3 пассажа в культуре клеток MDCK с регистрацией репродукции вируса по ЦПД и в РГА, как указано выше. При отрицательных результатах на протяжении трех пассажей исследование материала прекращали.

Хранение вирусосодержащей культуральной жидкости осуществляли при температуре -70°C . Титрование вируса гриппа в культуре клеток MDCK следующим образом: рассеивали клеточную суспензию на 96-луночные культуральные планшеты в концентрации 3×10^4 клеток/лунку. В качестве ростовой среды использовали питательную среду для культур клеток Игла-MEM с добавлением 10% фетальной сыворотки коров и раствора гентамицина сульфата в концентрации 50 мкг/мл. Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C в течение суток.

Готовили 10-кратные разведения имеющегося пула вируса на растворе Хенкса, начиная с разведения 10^{-1} . Планшеты с суточным монослоем клеток дважды отмывали раствором Хенкса и вносили разведения вируса в объеме 100 мкл в лунку, используя 8 лунок на разведение. Планшеты инкубировали в CO_2 -инкубаторе с температурой 37°C и подачей 5% CO_2 в течение 30 мин для адсорбции вируса, затем содержимое лунок удаляли и вносили в каждую лунку по 200 мкл поддерживающей среды. Планшеты инкубировали в CO_2 -инкубаторе с температурой 37°C и подачей 5% CO_2 . Ежедневно под микроскопом контролировали состояние монослоя клеток на наличие ЦПД. Окончательный учет титрования проводили на 7-е сутки.

Инфекционный титр вируса для культуры клеток MDCK рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в $\text{lgTCID}_{50}/\text{мл}$ (И.П. Ашмарин и др., 1962).

2.1.6 Внутривенный индекс патогенности

Внутривенный тест на индекс патогенности (IVPI) для вирусов проводили, как описано в Руководстве Всемирной организации здоровья животных (WOAH, 2018). Для определения патогенности штамма вируса гриппа А проводили расчет IVPI-индекса, так как известно, что данный индекс является численным показателем патогенности для птиц при внутривенном их заражении вирусом гриппа А. Определение IVPI проводили на 6-недельных цыплятах согласно протоколу. Десяти 6-недельным цыплятам, не имеющим специфических патогенов, внутривенно (в/в) инокулировали 0,1 мл, разведенной в соотношении 1:10 инфекционной аллантоисной жидкости (содержащей 10^6 EID₅₀ вируса). Цыплятам контрольной группы вводили внутривенно по 0,1 мл стерильного физиологического раствора. Цыплят ежедневно осматривали на предмет клинических признаков заболевания и гибели в течение 10 дней. Птиц содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды. Состояние каждого цыпленка при ежедневном наблюдении оценивали по шкале от 0 до 3 баллов. Индекс патогенности рассчитывали, как средний балл на птицу за одно наблюдение. Значение IVPI рассчитывали в соответствии с учетной формой протокола. Показатель 3 указывал на то, что все птицы погибли в течение 24 часов; индекс 0 означал, что ни у одной птицы не было признаков болезни в течение 10-дневного периода наблюдения. Штамм считают низкопатогенным при значениях IVPI от 0 до 1,2 и высокопатогенным – при значениях IVPI 1,2 и выше.

2.1.7 Определение патогенности штаммов вируса гриппа для мышей линии BALB/C

Животных, полученных для проведения исследований, выдерживали на карантине 3 суток. В течение этого времени проводили осмотр мышей на наличие у них признаков острых респираторных заболеваний (лихорадочные состояния, выделения из носовой полости, конъюнктивиты). Мышей заражали интраназально десятикратными разведениями вируссодержащей жидкости в объеме 50 мкл на одно животное. Для анальгезии и седации животных использовали «Золетил».

Животным контрольной группы вводили стерильный физиологический раствор в том же объеме. Всех животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды. Количество контрольных и инфицированных животных в каждом разведении учитывали в течение 14 суток после заражения. Летальную дозу стока ($LD_{50}/мл$) вычисляли по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева (И.П. Ашмарин и др., 1962).

Каждый образец ткани гомогенизировали в 1 мл минимальной эссенциальной среды Eagle's, содержащей антибиотики пенициллин и гентамицин, и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин; полученный супернатант использовали для инокуляции клеток MDCK с начальным разведением 1:10.

Все работы с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755), с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

2.1.8 Получение сывороток

На 21 день после заражения животные были подвергнуты эвтаназии, были собраны образцы крови и получена сыворотка. Предварительно сыворотки были обработаны RDE (Receptor destroying enzyme) для удаления неспецифических термостабильных ингибиторов. После чего их прогревали при температуре $56^{\circ}C$ в течение 30 минут. Образцы сыворотки были протестированы с помощью РТГА на выявление антител к вирусам.

2.1.9 Антигенный анализ

Антигенный анализ штаммов проводили с помощью теста на ингибирование гемагглютинации (РТГА) эритроцитами цыплят с использованием куриной поликлональной антисыворотки, полученной, как описано выше. РТГА проводилась в соответствии со стандартным протоколом WOAH (B.W. Jagger et

al., 2012). Наивысшее разведение сыворотки, которое полностью ингибировало гемагглютинацию, принималось за титр сыворотки (B.W. Jagger et al., 2012). Вирусы считались антигенно сходными, если разница в титрах составляла не более двукратного разведения.

2.1.10 Выделение РНК

РНК экстрагировали из собранных мазков с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб», по следующему алгоритму:

- 1) В пробирку с 300 мкл лизирующего раствора вносили 100 мкл аллантоисной жидкости, перемешивали на шейкере;
- 2) В течение 15 минут выдерживали раствор при температуре 65°C, на центрифуге убирали конденсат (3-5 секунд при 1000 об/мин);
- 3) Добавляли 500 мкл реагента для преципитации нуклеиновых кислот, перемешивали пробу 3-5 секунд;
- 4) Центрифугировали пробирку при 14000 об/мин в течение 15 минут;
- 5) Удаляли пипеткой супернатант, не задевая осадок;
- 6) К осадку приливали 500 мкл промывочного буфера No1;
- 7) Центрифугировали пробирку при 14000 об/мин в течение 5 минут;
- 8) Снова удаляли пипеткой супернатант, не задевая осадок;
- 9) Добавляли 300 мкл промывочного буфера No2;
- 10) Центрифугировали пробирку при 14000 об/мин в течение 5 минут;
- 11) Удаляли супернатант;
- 12) С открытыми крышками термостатировали пробирки 5 минут при температуре 65°C;
- 13) Приливали 50 мкл буфера для растворения нуклеиновых кислот и прогревали пробу 10 минут при температуре 65°C.
- 14) Центрифугировали 3-5 секунд при 1000 об/мин для осаждения капель;
- 15) Полученные препараты РНК хранили при -20°C не дольше 1 месяца, при температуре -70°C не дольше 1 года.

2.1.11 Реакция обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в реальном времени

Обратную транскрипцию проводили с использованием комплекта реагентов для получения к ДНК на матрице РНК для последующего анализа методом полимеразной цепной реакции Reverta-L (ИнтерЛабСервис, Москва, Россия).

При помощи набора реагентов получали кДНК вируса гриппа А. В пробирку с 10 мкл подготовленной реакционной смеси (RT-mix, 1 мкл RT-G-mix-1, 6 мкл ревертазы) вносили, используя наконечник с барьером, 10 мкл полученной РНК, пипетировали. Термостатировали полученную смесь при температуре 37°C 30 минут.

Полученный раствор с кДНК для проведения ПЦР разводили ДНК-буфером 1:1 и перемешивали.

Метод Real-time ПЦР применяли для поиска РНК вируса гриппа А в образцах. Основан на высечении флуорофора путем разрушения одноцепочечного ДНК-зонда. К одному концу ДНК-зонда химически присоединен флуорофор – флуоресцирующая молекула, к другому – молекула-гаситель флуоресценции. При нахождении зонда в растворе, либо, когда он комплементарно связан с целевой последовательностью – флуоресценции нет.

Тaq-полимераза, обладая 3'-экзонуклеазной активностью, при синтезе комплементарной цепи разрушает зонд, флуорофор и гаситель диффузно удаляются друг от друга – проявляется флуоресценция.

Эффективность ПЦР начинает падать из-за постепенной инактивации полимеразы, нехватки компонентов реакции, флуоресценция после экспоненциального роста выходит на «плато».

Метод PCR-RT используется в вирусологии для типирования и субтипирования вирусов. Часто используется в медицинской вирусологии, эпидемиологии.

Постановка ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени (Real-time ПЦР) с целью выявления вируса гриппа типа А проводилась на амплификаторе.

Всего производилось 53 цикла. Детекция флуоресценции осуществлялась на стадии отжига праймера. Внутренний положительный и отрицательный контроли дополнительно ставились в каждом раунде, чтобы исключить ложноположительные результаты.

Наличие вируса гриппа А в образце считалось доказанным при положительном результате Real-time ПЦР.

2.1.12 Секвенирование

Секвенирование полных геномов штаммов вируса гриппа проводили специалисты Центра коллективного пользования «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) после передачи им подготовленных образцов с помощью высокопроизводительного секвенирования нового поколения. Для полногеномного секвенирования вирусов РНК была выделена из аллантоисных жидкостей с использованием набора для очистки вирусной ДНК/РНК GeneJET (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и обработана ДНКазой TURBO DNase (Thermo Fisher Scientific, США).

Для приготовления библиотек ДНК использовали до 200 нг РНК с использованием набора для подготовки библиотеки РНК NEBNext Ultra (New England Biolabs, США). Секвенирование библиотек ДНК проводили с использованием набора реагентов версии 3 (600 циклов) с использованием MiSeq genome sequencer (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полноразмерные геномы были собраны de novo с помощью CLC Genomics Workbench v.9.5.3 (Qiagen, Хильден, Германия). Исходные данные последовательностей, которые были использованы для сборки, хранятся и доступны в “Центре геномики” (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия). с использованием секвенатора Illumina MiSeq и набора для подготовки ДНК-библиотеки Nextera XT (Illumina)

Для анализа использовали последовательности полных геномов, доступные в базах GeneBank и GISAID.

Часть штаммов секвенировали в рамках международной программы совместно с японским Институтом здоровья животных.

2.1.13 Филогенетический анализ

Определение субтипов восьми изолятов было проведено с использованием BLAST-анализа (базового инструмента поиска по локальному выравниванию, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) собранных последовательностей HA и NA. В частности, субтип определяли по высокому проценту идентичности нуклеотидных последовательностей генов HA и NA каждого изолята. Для построения филогенетических дендрограмм использовались последовательности сегментов геномов штаммов вирусов гриппа, выделенных на территории РФ, а также наиболее идентичные последовательности, полученные из различных регионов мира, выявленные в результате BLAST-анализа. Для каждой из полученных последовательностей сегментов вирусов гриппа был проведен поиск идентичных или наиболее похожих последовательностей с использованием алгоритма BLAST (с глубиной анализа 50) из базы данных GISAID.

Мы использовали алгоритм MUSCLE для получения множественных выравниваний последовательностей для каждого из 8 сегментов из доступных наборов данных. Для проверки полученные наборы последовательностей были подвергнуты многократному выравниванию с использованием алгоритма множественного выравнивания MAFFT v7.520 (загружаемая версия). Филогенетические дендрограммы нуклеотидных последовательностей сегментов вируса гриппа были построены методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстрэп-статистики указывали слева от ветвей

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Выбор оптимальных мест для проведения мониторинга вируса гриппа

Мониторинг циркуляции вируса гриппа диких птиц был организован в их естественной среде обитания. Для исследования были определены их основные места скопления и гнездования, а также территории, по которым проходили маршруты сезонных перелетов или кочевков диких птиц.

Из четырех основных миграционных путей, пересекающих территорию России, особое значение для территории западного побережья Среднего Каспия представляет восточноазиатский-африканский путь миграции. Этот путь выбирают птицы, летающие на зимовку и обратно из бореоарктических, северо-восточных и западносибирских районов России, Предуралья, Северной стороны Казахстана, Поволжья и северо-западного Каспия (Е.В. Вилков, 2006).

Общее количество мигрирующих птиц на западном побережье Каспия в 15 раз выше, чем на восточном. Это обуславливается южным положением моря, значительной протяженностью береговой линии (более 1200 км), благоприятным климатом и большим числом водно-болотных угодий (в отличие от восточного).

При выборе угодий, в которых проводился мониторинг, учитывалось наличие водоемов, объединяющих на своих территориях значительное количество диких птиц водного и околоводного комплекса, находящихся на пролетных путях. Возникающие контакты диких птиц, при их массовых скоплениях, способствуют распространению инфекционных заболеваний.

Основные морские водно-болотные угодья, являющиеся местами обитания диких птиц, относят к мелководным заливам, приустьевым участкам крупных рек, а также к побережью и прибрежным зонам островов. На территории прикаспийской части Республики Дагестан выделяются ряд водно-болотных угодий с наиболее высокой концентрацией околоводной популяции диких птиц во время сезонных миграций. Водно-болотные угодья озера Аджи (Папас), озера Южный Аграхан, Аграханского залива и дельты реки Терек, Ачикольской системы озер регулярно используются для сезонной охоты на водоплавающую дичь. Озеро Аджи находится примерно на 250 км южнее остальных районов.

Такая пространственная разобщенность указанных районов дает возможность отбора проб в разных физико-географических районах Прикаспийского региона. Это важно для обеспечения репрезентативности целевой выборки птиц. Помимо высокого разнообразия видового состава, важное значение имела и транспортная доступность районов, т.к. от этого зависит оперативность организации выездов на отбор проб в период охоты (А.Ю. Алексеев и др., 2019).

В соответствии с анализом литературы и по данным рекогносцировочной экспедиции были выбраны точки сбора материала, представленные на рисунке 14.



Рисунок 14 – Районы и точки сбора биологического материала от диких птиц (Murashkina T. et al, 2024)

2.2.2 Характеристика выборки птиц

На протяжении 2017 - 2020 гг. на территории западного побережья Среднего Каспия был собран и исследован биологический материал от 1438 особей диких птиц (таблица 1). Сбор был разделен на три сезона. Первый включал в себя сентябрь 2017 года - март 2018 года. Второй сезон включал сентябрь 2018 года - март 2019 года. Третий сезон включал сентябрь 2019 - март

2020 года (рисунок 15). Выбор данных сезонов (месяцев) был обусловлен также одним из основных критериев фаунистического разнообразия прибрежных местообитаний водоплавающих птиц, а именно тем, что в этот период здесь встречаются значительные скопления зимующих птиц (Е. В. Вилков, 2003).

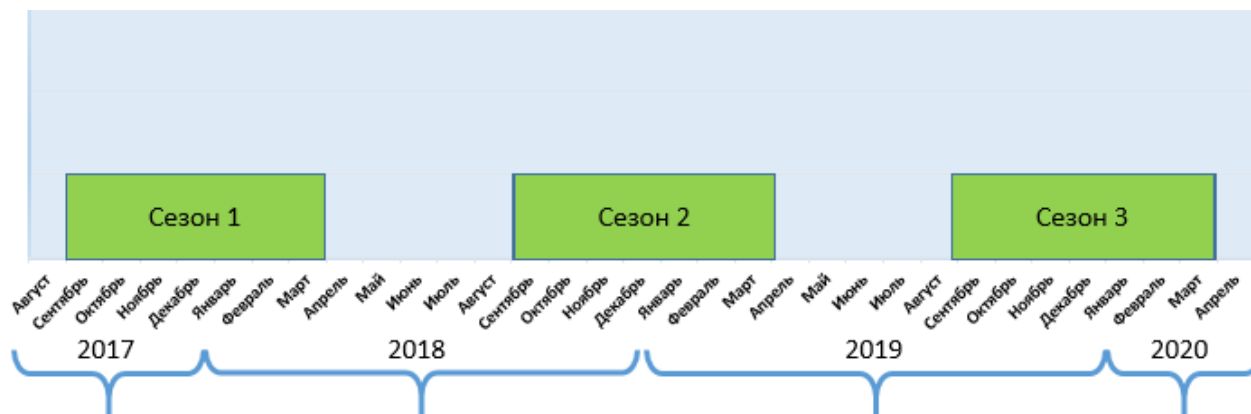


Рисунок 15 – Распределение по месяцам календарного года трех сезонов сбора биологического материала от диких птиц

Собранные образцы принадлежали птицам следующих отрядов: гусеобразные, ржанкообразные, курообразные, аистообразные, журавлеобразные, поганкообразные, пеликанообразные. Основное количество особей составили птицы двух отрядов – Гусеобразные (*Anseriformes*) и Журавлеобразные (*Gruiformes*). Процентное соотношение количества особей птиц данных отрядов составило от общего числа 55,42% и 40,89% соответственно. На долю остальных 5 отрядов птиц пришлось 3,55%.

Из исследованных 797 особей отряда Гусеобразные основная доля приходилась на четыре вида: кряква обыкновенная (*Anas platyrhynchos* n=196), чирок-свистунок (*Anas crecca* n=158), чирок-трескунок (*Anas querquedula* n=102), красноголовый нырок (*Aythya ferina* n=138) (рисунок 16). Отряд Журавлеобразные (*Gruiformes*) был представлен двумя видами: лысуха (*Fulica atra*) и камышница (*Gallinula chloropus*), где лысуха занимает основную часть (n=586).

Все представленные виды имеют широкую географическую распространенность на территории западного побережья Среднего Каспия и совершают миграции в регион с целью гнездования, а также, по данным литературы, могут являться носителями вируса гриппа А.

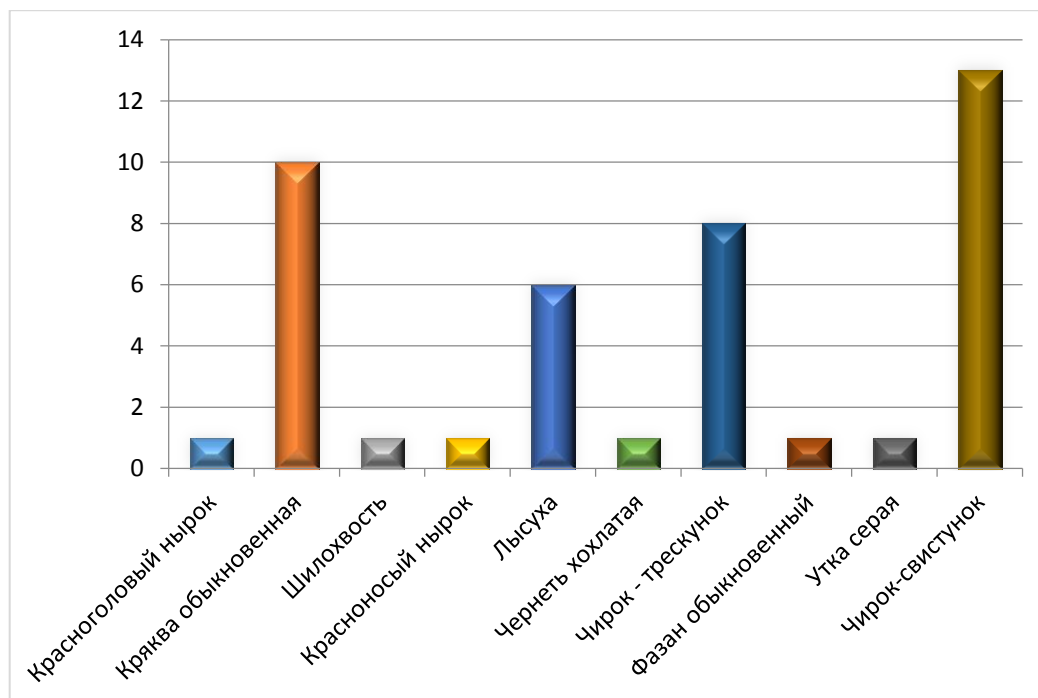


Рисунок 16 – Количество особей каждого вида, от которых было выделено 43 гемагглютинирующих изолята

Кроме вышеуказанных основных видов, наиболее представленных в выборке, в ходе работы было обследовано незначительное количество образцов от птиц менее представленных видов, таких как широконоска (*A. clypeata*), шилохвость (*A. acuta*), свиязь (*A. penelope*), серый гусь (*A. anser*), пеганка (*Tad. tadorna*). Указанные виды птиц также относятся к отряду гусеобразные, по данным литературы могут являться потенциальным резервуаром вирусов гриппа. Исследование данных видов птиц и обнаружение у них вируса является важным аспектом в изучении природного резервуара патогена.

Все видовое разнообразие диких птиц, от которых был собран и исследован биологический материал за 2017-2020 гг. на территории западного побережья Среднего Каспия, представлено в таблице 1.

2.2.3 Разнообразие и представленность вируса гриппа А в популяциях водоплавающих птиц западного побережья Среднего Каспия

В ходе вирусологического мониторинга 2017-2020 года на территории западного побережья Среднего Прикаспия отобранный биологический материал

Таблица 1 – Таксономическая принадлежность и количественная характеристика обследованной выборки диких птиц

Отряд	Семейство	Вид (лат.)	Количество			
			2017 - 2018	2018 - 2019	2019 - 2020	всего
Гусеобразные <i>Anseriformes</i> (55,39%)	Утиные <i>Anatidae</i>	Гусь гуменник <i>Anser fabalis</i>	-	1	-	1
		Гусь серый <i>Anser anser</i>	3	-	1	4
		Красноголовый нырок <i>Aythya ferina</i>	51	70	17	138
		Красноносый нырок <i>Netta rufina</i>	-	1	7	8
		Кряква обыкновенная <i>Anas platyrhynchos</i>	90	60	46	196
		Морская чернеть <i>Aythya marila</i>	-	2	-	2
		Пеганка <i>Tadorna tadorna</i>	4	2	4	10
		Связь <i>Anas penelope</i>	12	6	10	28
		Серая утка <i>Anas strepera</i>	33	15	22	70
		Хохлатая чернеть <i>Aythya fuligula</i>	15	11	3	29
		Чирок-свистун <i>Anas crecca</i>	121	5	32	158
		Чирок-трескун <i>Anas querquedula</i>	31	37	34	102
		Шилохвость <i>Anas acuta</i>	11	6	8	25
		Широконоска <i>Anas clypeata</i>	7	8	11	26
Журавлеобразные <i>Gruiformes</i> (40,93%)	Пастушковые <i>Rallidae</i>	Лысуха <i>Fulica atra</i>	73	254	259	586
		Камышница <i>Gallinula chloropus</i>	-	2	-	2
Поганкообразные <i>Podicipediformes</i> (0,14%)	Поганковые <i>Podicipedidae</i>	Большая поганка <i>Podiceps cristatus</i>	-	-	1	1
		Малая поганка <i>Tachybaptus ruficollis</i>	-	-	1	1
Курообразные <i>Galliformes</i> (0,07%)	Фазановые <i>Phasianidae</i>	Обыкновенный фазан <i>Phasianus colchicus</i>	1	-	-	1
Пеликанообразные <i>Pelecaniformes</i> (0,42%)	Баклановые <i>Phalacrocoracidae</i>	Большой баклан <i>Phalacrocorax carbo</i>	2	4	-	6
Ржанкообразные <i>Charadriiformes</i> (2,64%)	Чайковые <i>Laridae</i>	Чайка озерная <i>Larus ridibundus</i>	-	-	25	25
	Бекасовые <i>Scolopacidae</i>	Бекас <i>Gallinago gallinago</i>	9	-	1	10
		Фифи <i>Tringa glareola</i>	1	-	-	1
		Большой веретенник <i>Limosa limosa</i>	2	-	-	2
Аистообразные <i>Ciconiiformes</i> (0,28%)	Цаплевые <i>Ardeidae</i>	Серая цапля <i>Ardea cinerea</i>	1	-	1	2
		Большая выпь <i>Botaurus stellaris</i>	-	-	4	4
7 отрядов	8 семейств	26 видов	467	484	487	1438

от 1438 особей диких птиц был исследован с использованием стандартной методики WOAH на наличие в нем вируса гриппа А.

Таким образом, по результатам вирусологических исследований из 1438 образцов было получено 43 изолята гемагглютинирующих агентов. Большинство изолятов (n=36) было выделено от особей отряда Гусеобразные (*Anseriformes*) семейства Утиные (*Anatidae*). При этом основное количество изолятов было выделено от кряквы обыкновенной, чирка-трескунка и чирка-свистунка.

Шесть изолятов было выделено от лысухи (*Fulica atra*) семейства пастушковые (*Rallidae*) и 1 изолят был выделен от обыкновенного фазана (*Phasianus colchicus*) семейства фазановые *Phasianidae* (таблица 2).

Таблица 2 – Количество и представленность вирусов у диких птиц

Вид	Количество образцов	Количество НА изолятов	Количество AIV	Количество APMV	Процент изоляции гем.агентов (ДИ95%)
Кряква обыкновенная	196	10	6	4	5,10% (2,47- 9,18%)
Чирок-свистунок	158	13	8	4	8,23% (4,45-13,66%)
Чирок-трескунка	102	8	3	3	7,84% (3,45-14,87%)
Красноносый нырок	8	1	-	1	12,50% (0,32-52,65%)
Утка серая	70	1	1	-	1,43% (0,04-7,70%)
Красноголовый нырок	138	1	1	-	0,72% (0,02-3,97%)
Шилохвость	25	1	-	1	4,00% (0,10-20,35%)
Хохлатая чернеть	29	1	-	1	3,45% (0,09-17,76%)
Лысуха	586	6	2	-	1,02% (0,38-2,22%)
Фазан обыкновенный	1	1	-	1	100%*
Итого	1313	43	21	15	

Примечание: ДИ определялись при помощи метода Клоппера-Пирсона;

*- не является достоверным процентом распространенности

Среди видов, от которых были выделены изоляты, доминируют те, которые экологически связаны с водно-болотными местообитаниями или, так называемые, водно-болотные птицы. К водно-болотным птицам, от которых в данной работе были выделены гемагглютинирующие агенты, относятся все представители

семейств Утиные (*Anatidae*). От птиц данной группы было выделено 36 изолятов, что составило 84% от всех выделенных в данной работе изолятов. Также изоляты были выделены от представителей семейства Пастушковые (*Rallidae*) и Фазановые (*Phasianidae*), что составило 14% и 2% соответственно.

Из всех выделенных изолятов 49% составили вирусы гриппа птиц (Avian Influenza Virus, AIV), 35% парамиксовирусы птиц (Avian Paramyxoviruses), а 16% гемагглютинирующих агентов с помощью используемых методов идентифицировать не удалось. Результаты представлены в таблице 3.

По результатам субтипирования 21 выделенный штамм относились к следующим субтипам: HxNy (3), H1N1 (2), H3N8 (9), H4N6 (2), H7N3 (2), H8N4 (1), H10N5(1), H12N5 (1). Из всех выделенных штаммов 43% пришлось на H3N8. Все выделенные изоляты вируса птичьего гриппа являются низкопатогенными для домашней птицы по результатам теста IVPI (таблица 4).

Таким образом, по результатам мониторинга вируса гриппа птиц на территории западного побережья Среднего Прикаспия в период 2017-2020 гг, выделение вируса гриппа А составило 1,46% от общего количества исследованных особей.

Наибольшее количество птиц, от которых были выделены изоляты AIV принадлежали к виду чирок-свистунок и составило 8 особей. От кряквы обыкновенной было выделено 6 изолятов AIV, от чирка-трескунка 3 изолята AIV, от лысухи 2 изолята AIV и по одному изоляту было выделено от красноголового нырка и утки серой.

Наибольшее количество птиц, от которых были выделены изоляты гемагглютинирующих агентов в первом сезоне, принадлежали виду чирок-свистунок и составило 9 особей. От кряквы обыкновенной было выделено 4 изолята. Также по одному изоляту было выделено от следующих видов: красноголовый нырок, чирок-трескунок, фазан обыкновенный, утка серая.

Таблица 3 – Результаты субтипирования гемагглютинирующих агентов, выделенных в 2017-2020 гг.

№ п/п	Объект выделения	Вирус/Субтип	Наименование штамма
1.	кряква	H7N3	A/mallard/Dagestan/1050/2018
2.	кряква	H7N3	A/mallard/Dagestan/1051/2018
3.	кряква	H1N1	A/mallard/Dagestan/1092/2018
4.	кряква	H1N1	A/mallard/Dagestan/1093/2018
5.	фазан	APMV	Н.д.
6.	чирок-свистунок	H12N5	A/teal/Dagestan/1017/2018
7.	утка серая	H4N6	A/gadwall/Dagestan/156/2017
8.	чирок-свистунок	APMV6	APMV6/teal/Dagestan/62/2017
9.	чирок - трескунок	APMV4	APMV4/teal/Dagestan/143/2017
10.	чирок-свистунок	H3N8	A/teal/Dagestan/44/2018
11.	чирок-свистунок	APMV	Н.д.
12.	чирок-свистунок	H3N8	A/teal/Dagestan/114/2017
13.	чирок-свистунок	APMV6	APMV6/teal/Dagestan/130/2017
14.	чирок-свистунок	APMV	Н.д.
15.	чирок-свистунок	H3N8	A/teal/Dagestan/59/2017
16.	красноголовый нырок	H3N8	A/pochard/Dagestan/92/2017
17.	чирок-свистунок	H3N8	A/teal/Dagestan/670/2017
18.	чирок-свистунок	H3N8	A/teal/Dagestan/141/2017
19.	красноносый нырок	APMV	Н.д.
20.	чирок-свистунок	Н.д.	Н.д.
21.	чирок-свистунок	H3N8	A/teal/Dagestan/82/2017
22.	кряква	APMV4	APMV4/mallard/Dagestan/92d/2018
23.	шилохвость	APMV	Н.д.
24.	кряква	H10N5	A/mallard/Dagestan/004/2018
25.	лысуха	Н.д.	Н.д.
26.	чирок - трескунок	APMV	Н.д.
27.	чирок - трескунок	H3N8	A/teal/Dagestan/120/2017
28.	чирок - трескунок	H3N8	A/teal/Dagestan/23/2018
29.	чирок - трескунок	H8N4	A/teal/Dagestan/57/2018
30.	кряква	APMV4	APMV4/mallard/Dagestan/135c/2018
31.	чирок - трескунок	APMV	Н.д.
32.	лысуха	Н.д.	Н.д.
33.	чернеть хохлатая	APMV6	APMV6/ Tufted duck/Dagestan/194/2018
34.	лысуха	Н.д.	Н.д.
35.	кряква	APMV4	APMV4/mallard/Dagestan/59/2018
36.	кряква	APMV	Н.д.
37.	кряква	AIV	Н.д.
38.	чирок - трескунок	Н.д.	Н.д.
39.	чирок - трескунок	Н.д.	Н.д.
40.	лысуха	AIV	Н.д.
41.	лысуха	Н.д.	Н.д.
42.	лысуха	AIV	Н.д.
43.	чирок-свистунок	H4N6	A/teal/Dagestan/34/2017

Примечание: Н.д. – не удалось типировать/субтипировать

Таблица 4 – Вирусологические характеристики коллекции штаммов

Наименование штамма	Субтип	MDCK log ₁₀ TCID ₅₀ /mL	ПКЭ log ₁₀ EID ₅₀ /mL	IVPI
A/mallard/Dagestan/1050/2018	H7N3	5.4 ± 0.3	8.3 ± 0.3	0
A/mallard/Dagestan/1051/2018	H7N3	5.6 ± 0.3	8.3 ± 0.2	0
A/mallard/Dagestan/1092/2018	H1N1	5.0 ± 0.2	7.9 ± 0.4	0
A/mallard/Dagestan/1093/2018	H1N1	5.4 ± 0.2	8.0 ± 0.2	0
A/teal/Dagestan/1017/2018	H12N5	5.0 ± 0.2	7.9 ± 0.4	0
A/gadwall/Dagestan/156/2017	H4N6	5.1 ± 0.2	7.9 ± 0.4	0
A/teal/Dagestan/44/2018	H3N8	5.5 ± 0.2	7.9 ± 0.4	0
A/teal/Dagestan/114/2017	H3N8	5.3 ± 0.2	7.9 ± 0.4	0
A/teal/Dagestan/59/2017	H3N8	6.8 ± 0.2	8 ± 0.4	0
A/pochard/Dagestan/92/2017	H3N8	6.0 ± 0.3	7.9 ± 0.2	0
A/teal/Dagestan/670/2017	H3N8	5.2 ± 0.2	7.9 ± 0.4	0
A/teal/Dagestan/141/2017	H3N8	5.0 ± 0.2	7.7 ± 0.3	0
A/teal/Dagestan/82/2017	H3N8	7.4 ± 0.2	8.2 ± 0.4	0
A/mallard/Dagestan/004/2018	H10N5	5.0 ± 0.2	7.9 ± 0.4	0
A/teal/Dagestan/120/2017	H3N8	5.6 ± 0.2	7.7 ± 0.4	0
A/teal/Dagestan/23/2018	H3N8	5.0 ± 0.2	8.1 ± 0.4	0
A/teal/Dagestan/57/2018	H8N4	5.0 ± 0.2	7.6 ± 0.4	0
A/teal/Dagestan/34/2017	H4N6	5.0 ± 0.2	7.9 ± 0.4	0

Во втором сезоне наибольшее количество птиц, от которых были выделены изоляты гемагглютинирующих агентов принадлежали виду чирок-трескунок и составило 5 особей. От кряквы обыкновенной было выделено 3 изолята, от чирка-свистунка 2 изолята. Также по одному изоляту было выделено от следующих видов: лысуха, красноносый нырок, шилохвость.

В третьем сезоне наибольшее количество птиц, от которых были выделены изоляты гемагглютинирующих агентов принадлежали виду лысуха и составило 5 особей. От кряквы обыкновенной было выделено 3 изолята, от чирка-свистунка и чирка-трескунка по 2 изолята и один изолят был выделен от чернети хохлатой.

2.2.4 Вирусологические характеристики штаммов вируса гриппа А

Для собранной коллекции наиболее актуальных штаммов AIV была проведена оценка ростовых свойств в культурах клеток и развивающихся куриных эмбрионах для дальнейшего использования в качестве антигенов или вирусосодержащей суспензии для выделения генетического материала и молекулярно-биологических работ.

Для культивирования использовались культуры клеток MDCK и развивающиеся куриные эмбрионы. Интравенозный индекс патогенности определялся в соответствии с протоколом WOAH (WOAH, 2018). Результаты представлены ранее в таблице 4.

В результате культивирования было показано, что большая часть штаммов вируса гриппа культивировалась в присутствии трипсина на культурах клеток. Ожидается, более эффективно культивировались в системе развивающихся куриных эмбрионов, достигая максимальных титров $8.3 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL}$.

Патогенность для кур на модели IVPI оказалось низкой согласно критериям (WOAH, 2018).

Таким образом, в результате экспериментов можно сделать заключение, что все штаммы обладают вирусологическими характеристиками, характерными для низкопатогенных вирусов гриппа птиц (LPAI).

2.2.5 Молекулярно-биологический и филогенетический анализ сегментов внутренних белков

Мы определили последовательности полных геномов штаммов вируса гриппа птиц и задепонировали в международную базу данных GISAID (Приложение А). Из всех выделенных вирусов гриппа, для 14 штаммов получены нуклеотидные последовательности хорошего качества, с высокой степенью покрытия, что позволило использовать их в анализе. Дальнейший анализ проведен для этих полногеномных последовательностей. Ввиду сегментированности генома основного вируса-объекта исследования, филогенетические паттерны проанализированы посегментно. Наиболее

актуальными для такого анализа являются сегменты внутренних белков, которые не играют роли в качестве поверхностных антигенов и являются более консервативными по сравнению с сегментами HA и NA. Во время подготовки базы для выравниваний проводился BLAST-анализ исследованных в данной работе штаммов. В таблице 5 представлены результаты для некоторых штаммов редких субтипов, рассматриваемых подробно в разделе 2.2.6 Обоснование выбора этих штаммов для более детального анализа с включением сегментов поверхностных гликопротеинов представлено в разделе 2.2.5.7.

2.2.5.1 Филогенетический анализ сегмента генома PB2

Все исследованные штаммы по сегменту PB2 принадлежат к евразийской генетической линии вирусов гриппа птиц. Сегменты формируют несколько филогенетических групп, что указывает на генетическое разнообразие исследованных штаммов (рисунок 17). В частности, можно выделить две основные филогенетические группы, в пределах которых, в свою очередь, могут быть выделены по две подгруппы.

Сегменты PB2 штаммов A/pochard/Dagestan/92/2017, A/teal/Dagestan/120/2017 и A/gadwall/Dagestan/156/2017 формируют общую генетическую группу последовательностей, филогенетически близких к PB2 штаммов, выделенных в Азии и Африке. При этом PB2 штаммов A/pochard/Dagestan/92/2017 и A/teal/Dagestan/120/2017 схожие PB2 штаммов из Северной и Восточной Азии, а PB2 штамма A/gadwall/Dagestan/156/2017 родственен одноименному сегменту штаммов из Южной Азии и Северо-Восточной Африки.

PB2 остальных 11 схожи со штаммами, широко распространенными по территории Евразии, а также выделенными в Южной Азии и Северо-Восточной Африке. В частности, штамм A/teal/Dagestan/82/2017 по сегменту PB2 схож со штаммами из Сибири, Грузии, Ливана и Монголии. Большинство исследованных штаммов (10 штаммов) схожи между собой по сегменту PB2 и формируют общую

Таблица 5 – Ближайшие по идентичности нуклеотидных последовательностей сегменты генома к изученным нами вирусам H7N3, H10N5 и H12N5 из международной базы данных по результатам BLAST-анализа

Сегменты генома	A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3)	A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3)	A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5)	A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5)
1	2	3	4	5
PB2	A/teal/Chany/324/2017 (H12N5) A/Anas_platyrhynchos/Belgium/7828/2018 (H12N5) A/Anas_platyrhynchos/Belgium/7976/2018 (H4N2)	A/teal/Chany/324/2017 (H12N5) A/Anas_platyrhynchos/Belgium/7828/2018 (H12N5) A/Anas_platyrhynchos/Belgium/7976/2018 (H4N2)	A/mallard/Chany_Lake/18/2018 (H1N3) A/Shoveler/Chany_Lake/68/2019 (H12N5) A/Eurasian-teal/Egypt/P2-29/2017 (H6N2)	A/teal/Dagestan/23d/2018 (H3N8) A/teal/Chany/324/2017(H12N5) A/Common_Teal/Omsk_Region/54/2019 (H3N8)
PB1	A/Mallard/South_Korea/KNU2021-17/2021 (H3N8) A/wild_bird/Hunan/01.18_DTHBDF33/2019 (H9N2) A/duck/Hunan/S40304/2018 (H6N1)	A/Mallard/South_Korea/KNU2021-17/2021 (H3N8) A/wild_bird/Hunan/01.18_DTHBDF33/2019 (H9N2) A/duck/Hunan/S40304/2018 (H6N1)	A/mallard/Novosibirsk_region/957k/2018 (H3N8) A/duck/Egypt/N13735A/2017 (H5N8) A/chicken/Iran/17RS654-08/2016 (H5N8)	A/Common_Teal/Dagestan/34d/2019 (H4N6) A/duck/Hungary/1565_20VIR749-2/2020 (H5N8) A/chicken/Poland/004/2020 (H5N8)
PA	A/sandpiper/Tomsk/112/2019 (H14N7) A/duck/Assam/DUOR1512100004/2015 (H3N8) A/green_sandpiper/Kurgan/1050/2018 (H3N8)	A/sandpiper/Tomsk/112/2019 (H14N7) A/duck/Assam/DUOR1512100004/2015 (H3N8) A/green_sandpiper/Kurgan/1050/2018 (H3N8)	A/teal/Chany/324/2017 (H12N5) A/pintail/Novosibirsk_region/518k/2018 (H3N8) A/duck/Bangladesh/38285/2019 (H11N3)	A/duck/Bangladesh/38827/2019 (H11N3) A/duck/Bangladesh/38803/2019 (H11N3) A/wild_bird/Hunan/1.18_YYDTHBD114/2019 (H9N2)
HA	A/mallard_duck/Georgia/10/2016 (H7N7) A/common_teal/Shanghai/CM1216/2017 (H7N7) A/mallard/Tottori/31C/2019 (H7N7)	A/common_teal/Shanghai/CM1216/2017 (H7N7) A/mallard/Tottori/31C/2019 (H7N7) A/mallard_duck/Georgia/10/2016 (H7N7)	A/mallard/Egypt/EMC-4/2012 (H10N7) A/common_teal/Novosibirsk_region/3531k/2020 (H10N6) A/Northern_pintail/Egypt/EMC-1/2012 (H10N7)	A/teal/Chany/324/2017 (H12N5) A/shoveler/Ubinskoe_Lake/43/2017 (H12N5) A/common_teal/Poland/P079w24_mixed_H12N5/2018 (H12N5)
NP	A/mallard/Omsk_Region/63/2019 (H3N8) A/euraisan_coot/Novosibirsk_region/3493k/2020 (H3N8) A/teal/Egypt/MB-D-487OP/2016 (H7N3)	A/mallard/Omsk_Region/63/2019 (H3N8) A/euraisan_coot/Novosibirsk_region/3493k/2020 (H3N8) A/teal/Egypt/MB-D-487OP/2016 (H7N3)	A/duck/Mongolia/WKU-42/2022 (H3N8) A/duck/Mongolia/WKU-38/2022 (H3N8) A/duck/Bangladesh/36395/2018 (H4N6)	A/teal/Dagestan/23d/2018 (H3N8) A/duck/Bangladesh/18D725/2016 (H4N6) A/duck/Bangladesh/18D723/2016 (H4N6)

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5
NA	A/teal/Egypt/MB-D-487OP/2016 (H7N3) A/teal/Egypt/MB-D-698C/2016 (H7N3) A/northern_shoveler/Egypt/MB-D-695C/2016 (H7N3)	A/teal/Egypt/MB-D-487OP/2016 (H7N3) A/teal/Egypt/MB-D-698C/2016 (H7N3) A/northern_shoveler/Egypt/MB-D-695C/2016 (H7N3)	A/maillard/Novosibirsk_region/962k/2018 (H12N5) A/duck/Cambodia/C70W14M/2018 (H7N5) A/teal/Chany/324/2017 (H12N5)	A/teal/Chany/324/2017 (H12N5) A/shoveler/Ubinskoe_Lake/43/2017 (H12N5) A/Anas_platyrhynchos/Belgium/7828/2018 (H12N5)
MP	A/ostrich/South_Africa/18090431/2018 (H11N1) A/Duck/Mongolia/2021-MG05/2021 (H3N6) A/ostrich/South_Africa/0107-21/2019 (H11N1)	A/ostrich/South_Africa/18090431/2018 (H11N1) A/Duck/Mongolia/2021-MG05/2021 (H3N6) A/ostrich/South_Africa/0107-21/2019 (H11N1)	A/Duck/Mongolia/2021-MG05/2021 (H3N6) A/green_sandpiper/Kurgan/1050/2018 (H3N8) A/green_sandpiper/Kurgan/1046/2018 (H3N8)	A/duck/Mongolia/876/2019 (H3N8) A/duck/Mongolia/961/2019 (H3N8) A/pintail/Novosibirsk_region/519k/2018 (H3N8)
NS	A/Mallard/South_Korea/KNU2021-17/2021 (H3N8) A/Tufted_Duck/Novosibirsk_region/989k/2018 (H3N8) A/gadwall/Novosibirsk_region/3407k/2020 (H4N6)	A/Mallard/South_Korea/KNU2021-17/2021 (H3N8) A/Tufted_Duck/Novosibirsk_region/989k/2018 (H3N8) A/gadwall/Novosibirsk_region/3407k/2020 (H4N6)	A/duck/Bangladesh/36395/2018 (H4N6) A/duck/Bangladesh/18D1571/2021 (H6N1) A/duck/Bangladesh/17D1586/2021 (H6N1)	A/maillard/Netherlands/19001282-001/2019 (H5N1) A/duck/Netherlands/18018989-011015/2018 (H5N3) A/swan/Netherlands/18019125-002/2018 (H5N3)

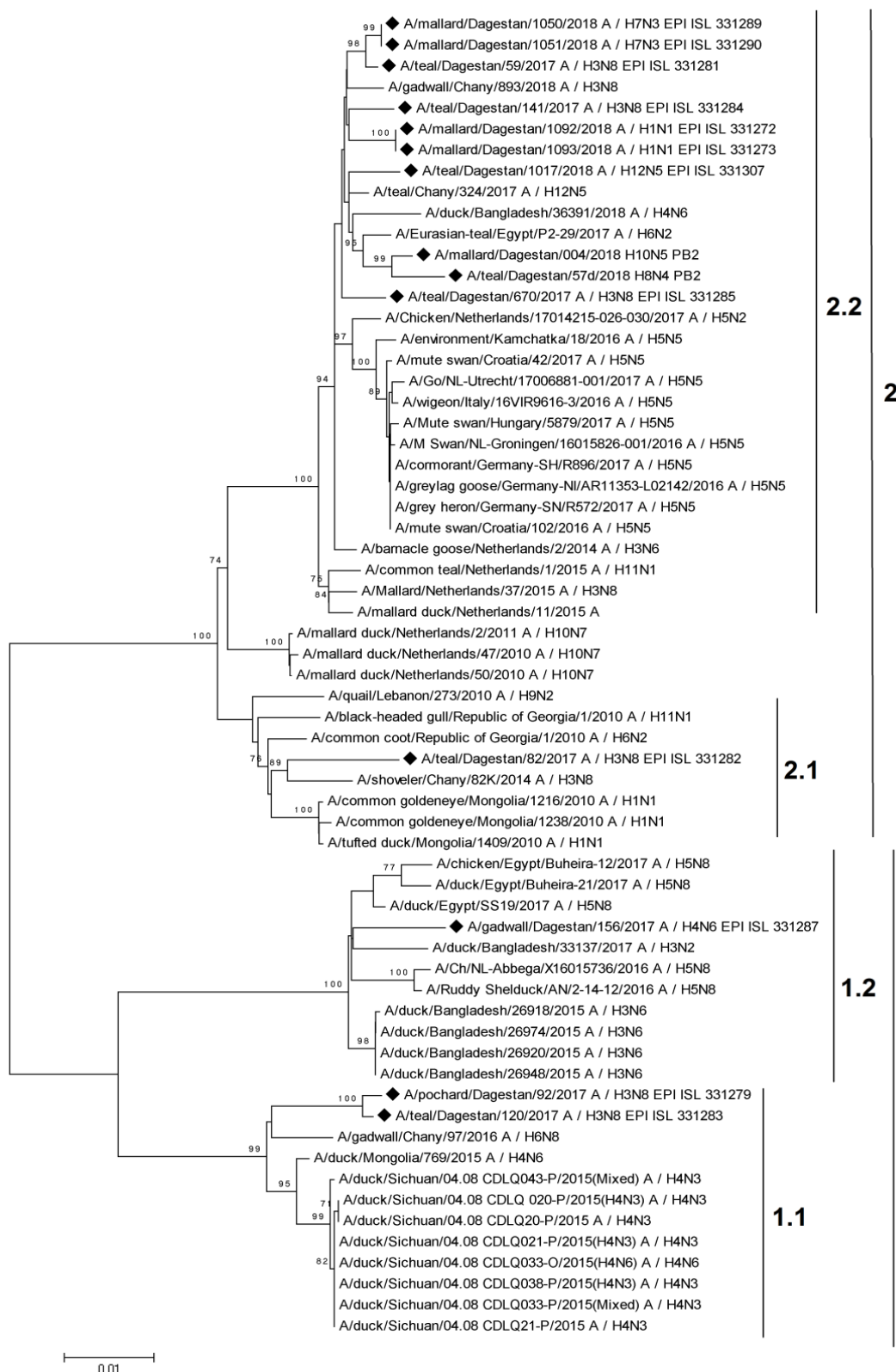


Рисунок 17 – Филогенетический анализ сегмента генома PB2 штаммов вируса гриппа птиц, изолированных в ходе исследования на территории западного побережья Среднего Каспия (2017-2019 гг).

филогенетическую группу со штаммами из Сибири (оз. Чаны), Южной Азии и Северо-Восточной Африки (Бангладеш и Египет), с Камчатки, а также из Европы (Хорватия, Италия, Венгрия, Нидерланды, Германия). Примечательно, что в этой филогенетической подгруппе отсутствуют штаммы из Монголии и Китая.

2.2.5.2 Филогенетический анализ сегмент генома PB1

По сегменту PB1 все исследованные штаммы относятся к евразийской генетической линии вирусов гриппа птиц. Последовательности формируют две основных филогенетических группы, одну из которых также можно подразделить на подгруппы (рисунок 18). Отдельная филогенетическая группа сформирована PB1 штаммов A/mallard/Dagestan/004/2018, A/teal/Dagestan/82/2017 и A/teal/Dagestan/1017/2018, а также штаммов, изолированных в Передней Азии, Южной Азии, Восточной Азии, Северной Азии и Северо-Восточной Африке. В частности, в Египте (наиболее схожи со штаммом A/mallard/Dagestan/004/2018), Сибири, Грузии, Монголии и Бангладеш (схожи со штаммом A/teal/Dagestan/1017/2018).

Вторую филогенетическую группу можно разделить на 5 подгрупп. Сегменты PB1 штаммов A/pochard/Dagestan/92/2017 и A/teal/Dagestan/141/2017 схожи с PB1 штаммов, выделенных на территории Европы (Чехия, Польша, Венгрия, Германия), а также одиночный штамм со схожим сегментом PB1 был обнаружен в Сибири. PB2 штаммов субтипа H7N3 A/mallard/Dagestan/1050/2018 и A/mallard/Dagestan/1051/2018 формируют отдельную филогенетический кластер, к которому наиболее генетически близки PB1 штаммов субтипа H6N2, выделенных в Китае в 2015 году. Штамм A/teal/Dagestan/670/2017 (H3N8) по сегменту PB1 схож со штаммами, позднее выделенными (2018) на оз. Чаны (Сибирь). PB1 штаммов A/mallard/Dagestan/1092/2018 и A/mallard/Dagestan/1093/2018 схожи с PB1 штаммов, ранее (2016) изолированных в Египте. Сегменты PB1 остальных штаммов (A/teal/Dagestan/59/2017, A/teal/Dagestan/120/2017, A/gadwall/Dagestan/156/2017, A/teal/Dagestan/57d/2018) подобны PB1 штаммов

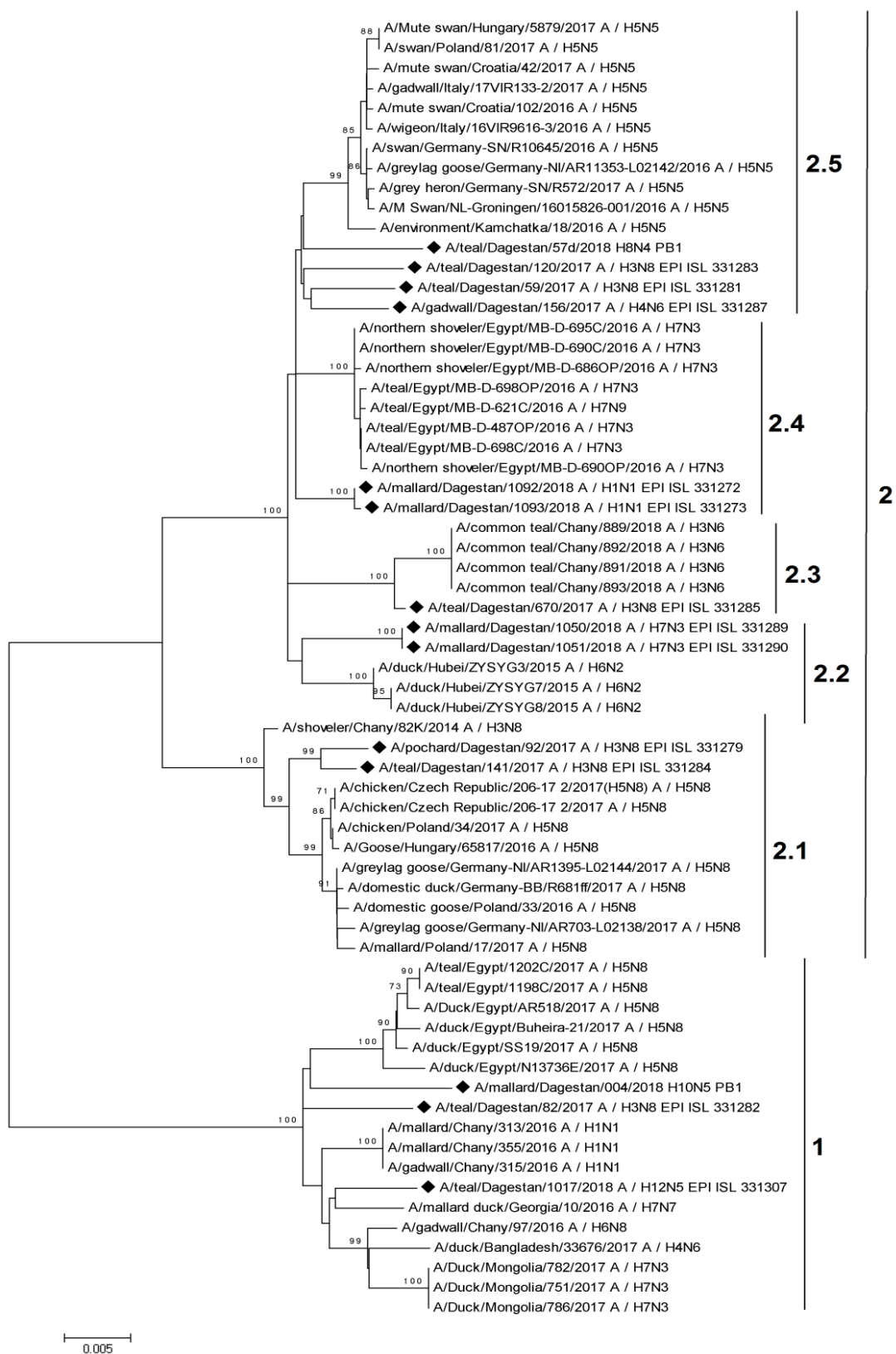


Рисунок 18 – Филогенетический анализ сегмента генома PB1 штаммов вируса гриппа птиц, изолированных в ходе исследования на территории западного побережья Среднего Каспия (2017-2019 гг)

вируса гриппа птиц из Европы (Венгрия, Хорватия, Польша, Италия, Германия) и с территории Камчатки.

2.2.5.3 Филогенетический анализ сегмента генома PA

Все исследованные штаммы по сегменту PA принадлежат к Евразийской генетической линии вирусов гриппа птиц и формируют на дендрограмме две основные филогенетические группы, которые, в свою очередь, разделяются на подгруппы (рисунок 19).

Последовательности PA штаммов первой филогенетической группы (A/teal/Dagestan/57d/2018, A/mallard/Dagestan/1092/2018 и A/mallard/Dagestan/1093/2018) схожи с PA штаммов, выделенных на территории Восточной Азии (Монголия), Северной Азии (Сибирь), Южной Азии (Бангладеш), Северо-Восточной Африки (Египет), Западной и Северной Европы (Нидерланды, Швеция). При этом штамм A/teal/Dagestan/57d/2018 по сегменту PA наиболее схож со штаммами из Сибири (оз. Чаны), а штаммы A/mallard/Dagestan/1092/2018 и A/mallard/Dagestan/1093/2018 подобны вариантам вируса гриппа, выделенным в Европе.

Последовательности PA штаммов подгруппы 2.1 второй филогенетической группы подобны PA штаммов, выделенных в Южной Азии, Передней Азии и Северной Азии. Штаммы же филогенетической подгруппы 2.2 по сегменту PA схожи с вариантами вируса гриппа птиц, выделенными главным образом в Северной Азии, Восточной Азии и на Дальнем Востоке.

2.2.5.4 Филогенетический анализ сегмента генома NP

Последовательности сегментов NP всех исследованных штаммов относятся к евразийской генетической линии вирусов гриппа птиц и формируют две основных филогенетических групп и несколько подгрупп в рамках этих групп (рисунок 20). Первая филогенетическая группа сформирована последовательностями NP штаммов из Дагестана, а также штаммов, изолированных в Европе, Передней Азии, Восточной Азии и на

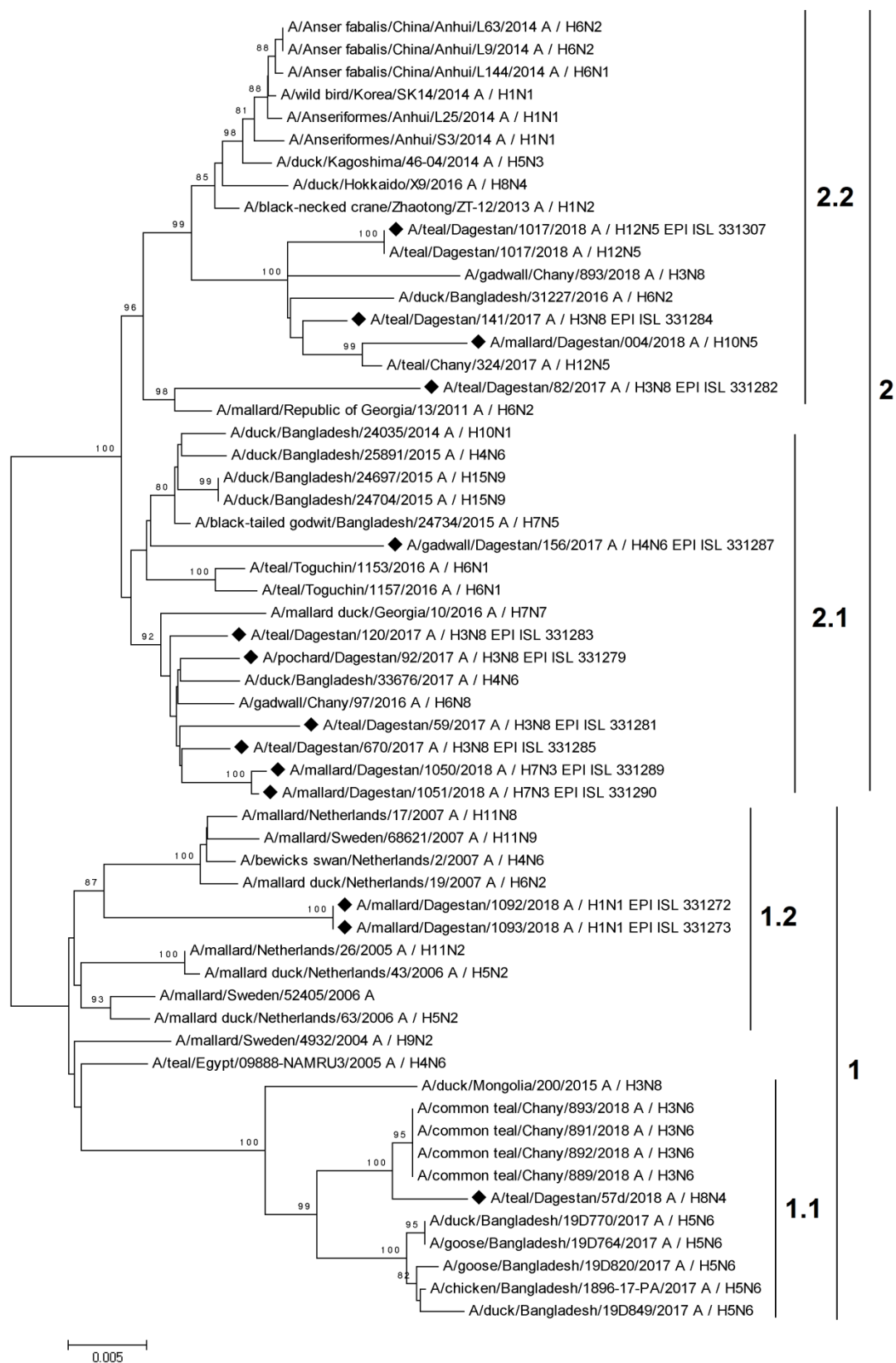


Рисунок 19 – Филогенетический анализ сегмента генома РА штаммов вируса гриппа птиц, изолированных в ходе исследования на территории западного побережья Среднего Каспия (2017-2019 гг)

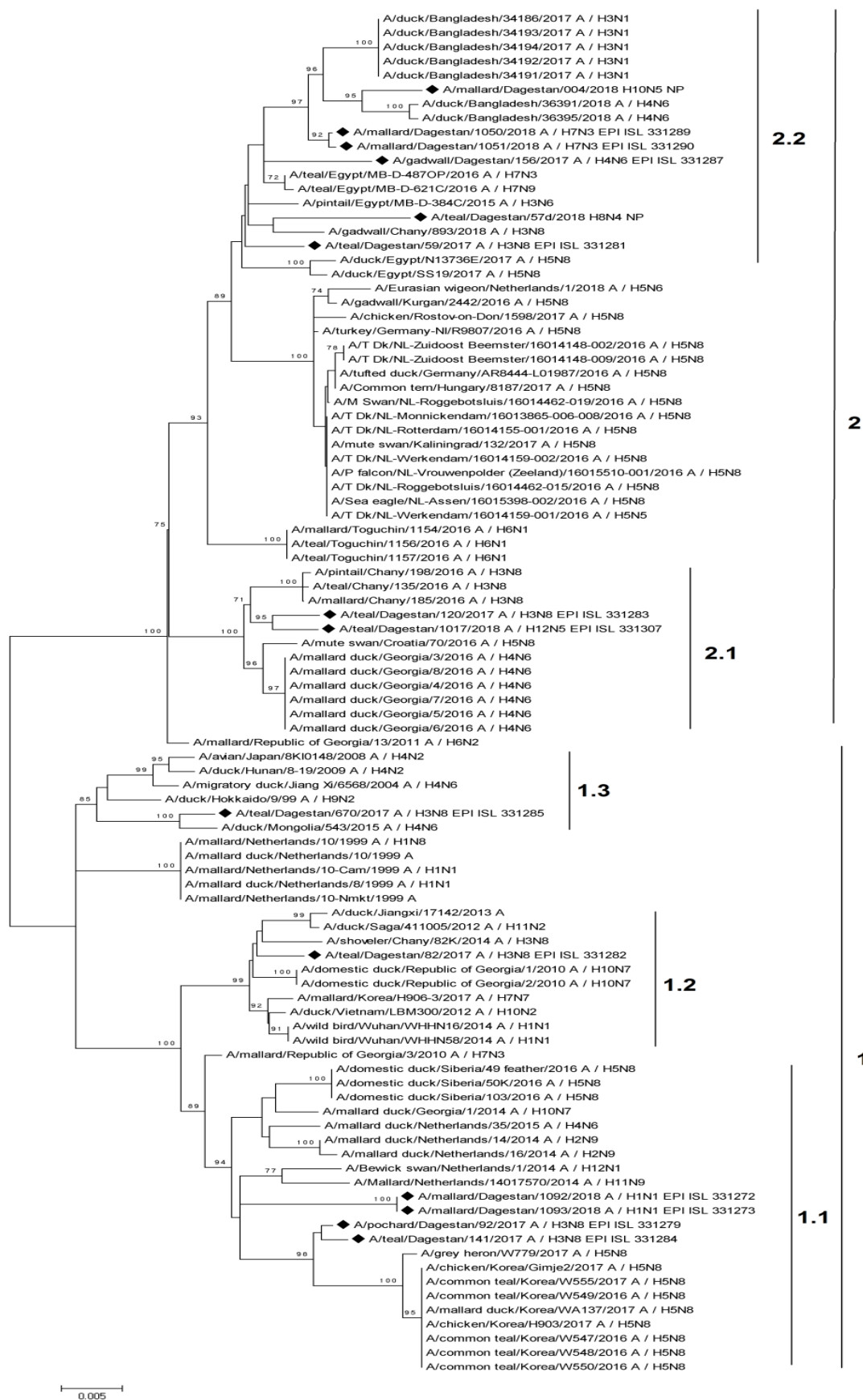


Рисунок 20 – Филогенетический анализ сегмента генома NP штаммов вируса гриппа птиц, изолированных в ходе исследования на территории западного побережья Среднего Каспия (2017-2019 гг)

Дальнем Востоке. При этом последовательности сегмента NP штаммов A/mallard/Dagestan/1092/2018, A/mallard/Dagestan/1093/2018, A/pochard/Dagestan/92/2017 и A/teal/Dagestan/141/2017 схожи с NP различных субтипов, выделенных в Европе и Передней Азии, а также с NP высокопатогенных штаммов субтипа H5N8, изолированных в Сибири и Корее. Последовательность сегмента NP штамма A/teal/Dagestan/82/2017 относится к другой филогенетической подгруппе и близка к NP штаммов вируса гриппа птиц, выделенных в Передней Азии, Северной Азии, Восточной и Юго-Восточной Азии.

Третья подгруппа сформирована последовательностью NP штамма A/teal/Dagestan/670/2017 и схожими с ней NP вариантов вируса гриппа, выделенных в Восточно-Азиатском регионе. Кроме того, в 1999 году в Нидерландах были выделены штаммы вируса гриппа со схожим сегментом NP.

Во второй филогенетической группе выделяются штаммы A/teal/Dagestan/120/2017 и A/teal/Dagestan/1017/2018 субтипов H3N8 и H12N5 соответственно, которые по сегменту NP схожи между собой, а также подобны штаммам, выделенным в Сибири, Хорватии и Грузии (т.е. Северной Азии, Передней Азии и Восточной Европе). Остальные штаммы второй филогенетической группы формируют подгруппу, прежде всего, совместно со штаммами из Южной Азии, Северной Азии, Северо-Восточной Африки.

2.2.5.5 Филогенетический анализ сегмента MP

Сегменты MP всех исследованных штаммов, изолированных в Дагестане, принадлежат к Евразийской генетической линии вирусов гриппа птиц. На филогенетической дендрограмме можно выделить 3 основных филогенетических группы (рисунок 21). Первую образуют нуклеотидная последовательность MP штамма A/teal/Dagestan/82/2017 и схожие с ней MP штаммов, выделенных в Северной и Восточной Азии (в т.ч. Дальнего Востока). Штамм A/teal/Dagestan/141/2017 также по сегменту MP подобен вариантам

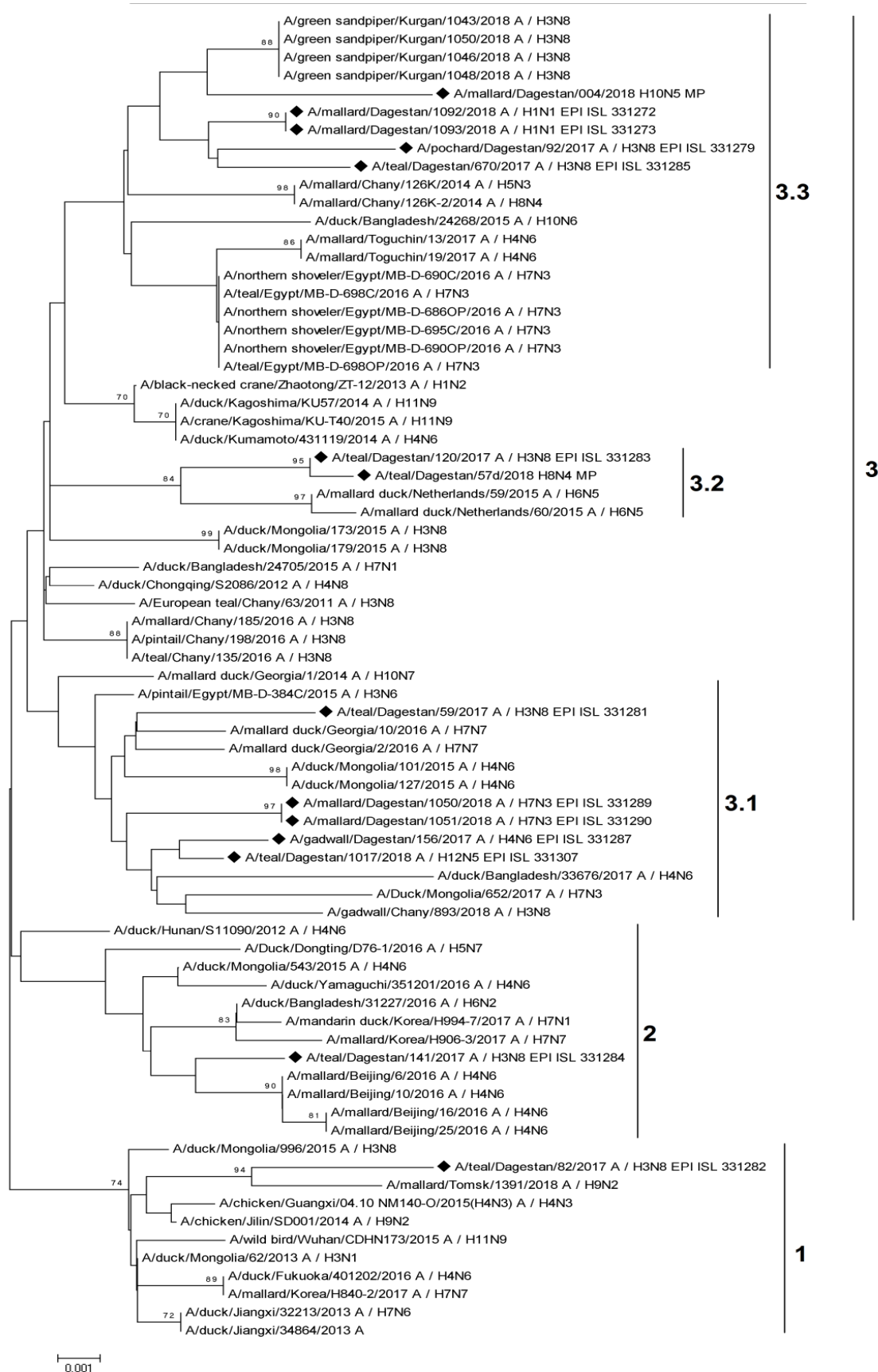


Рисунок 21 – Филогенетический анализ сегмента генома МР штаммов вируса гриппа птиц, изолированных в ходе исследования на территории западного побережья Среднего Каспия (2017-2019 гг)

вируса гриппа из Восточной Азии (в т.ч. Дальнего Востока) и, кроме того, схож с вирусом из Южной Азии (Бангладеш).

Сегменты МР остальных штаммов входят в третью филогенетическую группу, в рамках которой формируют три подгруппы. В первую подгруппу (3.1) входят штаммы из Дагестана и схожие с ними по сегменту МР штаммы с территории Азии (Восточная, Передняя, Северная и Южная), а также Северо-Восточной Африки. Штаммы A/teal/Dagestan/120/2017 и A/teal/Dagestan/57d/2018 (подгруппа 3.2) наиболее схожи со штаммами из Европы (Нидерланды).

МР штаммов A/mallard/Dagestan/004/2018, A/mallard/Dagestan/1092/2018, A/mallard/Dagestan/1093/2018, A/pochard/Dagestan/92/2017 и A/teal/Dagestan/670/2017 (подгруппа 3.3) схожи с МР штаммов, выделенных Северной Азии, Южной Азии и Северо-Восточной Африке.

2.2.5.6 Филогенетический анализ сегмента NS

Сегменты NS всех исследованных штаммов вируса гриппа из Дагестана относятся к Евразийской генетической линии. Кроме того, согласно филогенетической дендрограмме, они подразделяются на две кардинально различные генетических группы – т.н. «аллель А» и «аллель В» NS вируса гриппа (рисунок 22). Таким образом, в акватории Каспийского моря встречаются вирусы гриппа, содержащие наиболее генетически различные сегменты NS. Далее, в рамках этих групп сегменты NS разделяются на подгруппы.

Входящие в аллель А NS штаммов A/mallard/Dagestan/1092/2018, A/mallard/Dagestan/1093/2018 и A/mallard/Dagestan/004/2018 схожи с NS вирусов гриппа птиц, выделенных в Европе, Передней Азии, Южной Азии, Юго-Восточной Азии и Северо-Восточной Африке. Штаммы второй подгруппы аллеля А (A/gadwall/Dagestan/156/2017, A/mallard/Dagestan/1050/2018 и A/mallard/Dagestan/1051/2018) схожи с вариантами вируса гриппа птиц из Европы, Передней Азии, Северной Азии и Восточной Азии (крупный кластер штаммов из Китая).

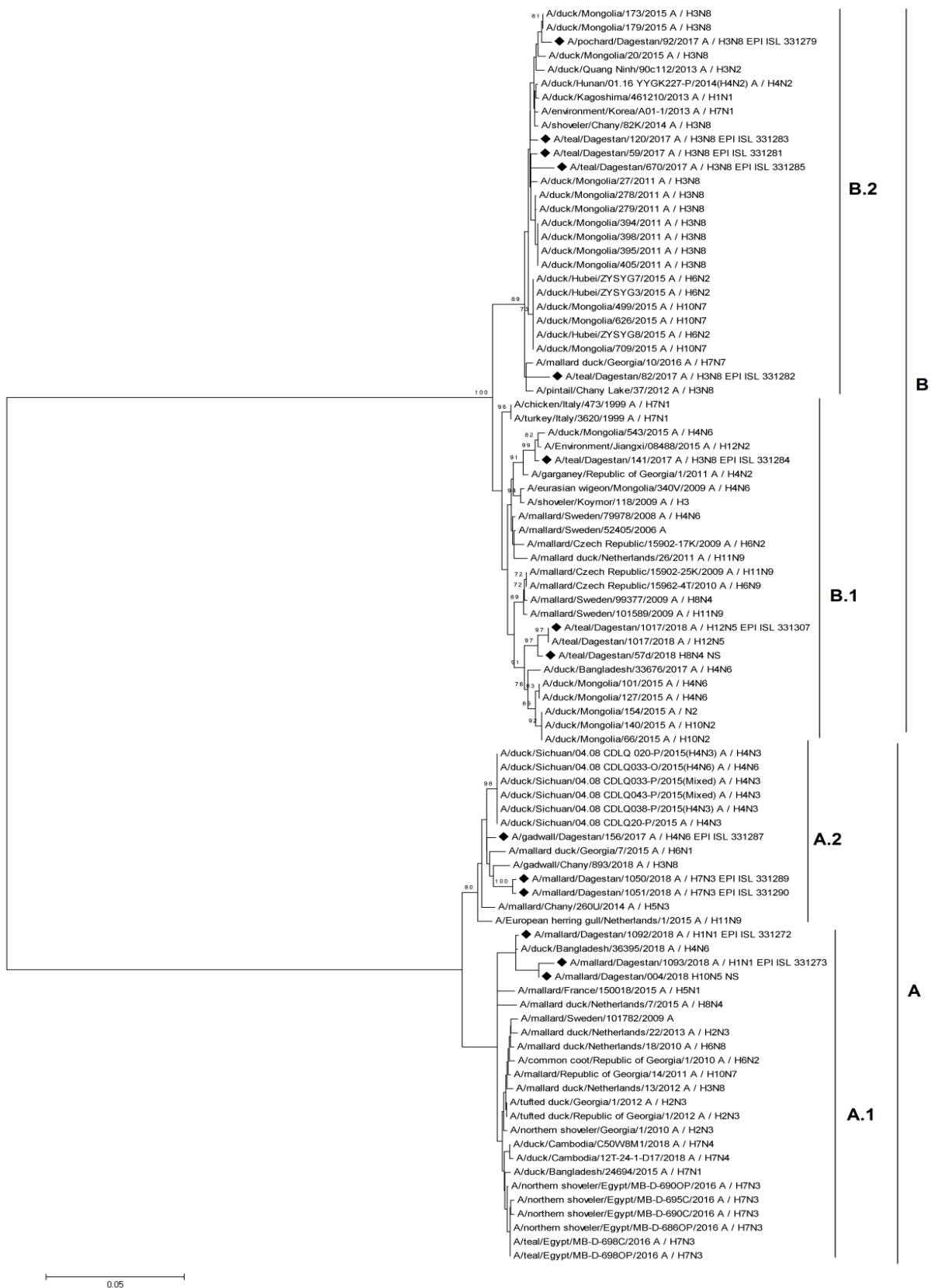


Рисунок 22 – Филогенетический анализ сегмента генома NS штаммов вируса гриппа птиц, изолированных в ходе исследования на территории западного побережья Среднего Каспия (2017-2019 гг)

NS аллеля В также подразделяются на две подгруппы. Последовательности NS A/teal/Dagestan/141/2017, A/teal/Dagestan/1017/2018 и A/teal/Dagestan/57d/2018 филогенетически близки к NS штаммов из Западной, Северной и Восточной Европы, Передней Азии, Восточной Азии и Южной Азии (в т.ч. выделенных значительно раньше – в 1999-2009 гг.). Остальные штаммы аллеля В формируют филогенетическую подгруппу со штаммами, выделенными, главным образом, в Азиатском регионе (Восточная Азия и, в том числе, Дальний Восток, а также несколько штаммов из Северной Азии и Передней Азии).

Обобщая результаты филогенетического анализа, можно заключить, что штаммы вируса гриппа птиц, выделенные в акватории Каспийского моря генетически различны между собой, и формируют кластеры, филогенетически схожих штаммов с вариантами вируса гриппа, изолированными по всей территории Евразии, а также Северо-Восточной Африки. Схожие штаммы выделялись не только в «меридианальном» направлении, что соответствует пролетным путям с севера на юг и обратно, но и в широтном. При этом ареал фиксации схожих геномных сегментов в широтном направлении выходит за рамки отдельных пролетных путей, что указывает на смешивание в крупных акваториях и озерных системах различных генетических вариантов вируса гриппа птиц, распространяющихся по различным пролетным путям. Однако, для отдельных штаммов была показана консервативность распространения геномных сегментов: например, нуклеотидные последовательности генетической подгруппы 2.2 аллеля А филогенетической дендрограммы для сегмента NS характерны для штаммов, циркулирующих в Восточно-Азиатском регионе, в то время как последовательности NS подгруппы 2.1 того же аллеля А характерны не только для азиатских вариантов вируса, но и для европейских. Кроме того, в рамках филогенетических подгрупп была показана консервативность сегментов генома. В частности, по сегменту NP штаммы A/teal/Dagestan/120/2017 и A/teal/Dagestan/57d/2018, а также A/gadwall/Dagestan/

156/2017 и A/teal/Dagestan/1017/2018 попарно максимально схожи между собой, несмотря на то, что были изолированы в разные сезоны сбора образцов.

Отдельно был изучен вирус гриппа H12 субтипа. Поскольку подтип H12 редко обнаруживается у диких птиц, в этом исследовании были изучены биологические характеристики и проведен полногеномный анализ пяти вирусов H12N5 и одного вируса H12N2 и провели сравнение с данными базы GISAID с точки зрения эволюционной экологии вирусов гриппа птиц в Северной Евразии. Представленные здесь данные и результаты дополняют знания об экологии редких субтипов AIV. Кроме того, была проведена оценка патогенного риска этих вариантов с точки зрения их потенциальной угрозы для человека.

Шесть вирусов гриппа A/H12Nx были выделены от диких перелетных птиц осенью 2017 и 2018 гг. в рамках ежегодного мониторинга гриппа. Все вирусы были выделены от птиц семейства *Anatidae*. Четыре из них (A/43, A/324, A/962 и A/999) были изолированы в Западной Сибири, один – в Каспийском регионе (A/1017), один – на Дальнем Востоке России (A/1377-Amer). Подтипы вируса определяли на основе первичной последовательности генов гемагглютинаина и нейраминидазы. Пять вирусов принадлежали подтипу H12N5, и один вирус принадлежал подтипу H12N2. Нуклеотидные последовательности шести вирусов H12 депонированы в Глобальной инициативе по совместному использованию всех данных о гриппе (GISAID) под следующими номерами: EPI_ISL_331295 (A/teal/Chany/324/2017), EPI_ISL_331306 (A/shoveler/Ubinskoe_Lake/43/2017), EPI_ISL_331307 (A/teal/Dagestan/1017/2018), EPI_ISL_337402 (A/mallard/Novosibirsk region/962k/2018), EPI_ISL_337571 (A/shoveler/Novosibirsk region/999k/2018) и EPI_ISL_389024 (A/teal/Russia_Primorje/18-1377/2018).

Для филогенетического анализа использовали последовательности H12 HA, N2 и N5 NA, а также внутренние гены из базы данных GISAID (по состоянию на май 2020). Последовательности AIV, которые получены в Федеральном исследовательском центре фундаментальной и трансляционной

медицины, были обработаны и выровнены с последовательностями из GISAID. После выравнивания последовательности использовали в филогенетическом анализе, выполненном с использованием FastTree. Последовательности, принадлежащие кладе с участием российских изолятов из настоящего исследования, были извлечены из первого узла, где значение bootstrap-анализа достигло $\geq 95\%$ от периферии клады, и отобраны для дальнейшего филогеографического анализа.

Все изоляты H12N5 в настоящем исследовании разделяли несколько сегментов с AIV в Южной и Восточной Азии, таких как Бангладеш, Индия, Китай, Корея и Япония. Для каспийского штамма была разработана схема вероятного распространения сегментов, которая доказывает наличие гетерологичного генного пула у вирусов животных Каспийского региона.

Генетическая связь AIV, выделенных в Новосибирской области, с AIV по всему Евразийскому континенту может быть объяснена перекрытием нескольких миграционных путей, включая Черноморско-Средиземноморский, Восточноафриканский – Западно-Азиатский, Центральноеазиатский пролетный путь и Восточно-Азиатский– Австралийский пролетные пути в Новосибирской области.

Точки выделения вирусов A/324, A/962, A/999 и A/43 расположены на юге Западной Сибири, который является частью Западно-Сибирско-Казахстанско-Каспийской территориальной группировки птиц, и расположены на пересечение трех пролетных путей: среднеазиатского, средиземноморского. Центральное-Азиатский пролет (CAF), также называемый Центральное-азиатско-индийским или Центральное-азиатско-южно-азиатским, является пролетом, охватывающим большую континентальную область Евразии между Северным Ледовитым океаном и Индийским океаном и связанными островными цепями.

Западная часть Каспийского моря, где был выделен вирус A/1017, связана с двумя территориальными группами птиц: западносибирской - казахстанско-каспийской и центральноевропейской - южноевропейской и расположена в районе пересечения двух средиземноморский пролетных путей. Для

территории Каспийского региона и Дагестана азиатско-восточноафриканский пролетный путь имеет особое значение. Птицы ежегодно летают вдоль этого пути в районы размножения в бореальной Арктике, Северо-Восточной и Западно-Сибирской областях России, на Урале, в Северном Казахстане, Поволжье и на северо-западе Каспия, а затем обратно. Азиатско-восточноафриканский пролетный путь — это хорошо изученный маршрут, по которому многие виды птиц ежегодно мигрируют между срединно-палеарктическими местами размножения в Азии и не размножающимися участками в восточной и южной частях Африки (Э.В. Кумари, 2020). Поэтому, принимая во внимание расположение точек изоляции вируса H12 в Сибири и Каспийском море, можно использовать данные карты и анализ филогенетических деревьев, чтобы предположить связи между исследуемыми сегментами и другими филогенетически подобными генетическими пулами вирусов, которые были выделены в Египте, на Кавказе (Грузия), Южная и Центральная Европа, Балканы, Монголия и Китай. В данном исследовании было обнаружено, что H12N2 AIV обладает четко выраженным генным сочетанием: три сегмента генома A/1377-Amer (HA, NP и NS) с Дальнего Востока России принадлежат к североамериканской генетической линии, тогда как все остальные сегменты (PB2, PB1, PA, NA, MP) относятся к евразийским вариантам AIV. Родственные североамериканские штаммы были выделены не только в северной части континента (Аляска и Канада), которая географически близка к российскому Дальнему Востоку, но и по всей Америке, включая Южную Америку и оба побережья (Запад и Восток). В целом изоляты из Сибирского региона имели филогенетическое сходство с AIV разных подтипов, выделенных через Евразийский континент от Западной и Северной Европы на западе до Камчатки и Японии на востоке и от Сибири на севере до Бангладеш, Египет, и Пакистан на юге. Кроме того, сибирские штаммы отличаются друг от друга и образуют филогенетические группы, которые различаются для разных сегментов. Это указывает на смешение в Сибирском регионе различных генетических вариантов вируса птичьего гриппа, циркулирующего в Евразии.

Интересно, что, несмотря на прочные филогенетические связи между штаммами из Сибири и штаммами, выделенными в Восточной Азии (Юго-Восточный Китай, Япония, Корея и Таиланд), они не похожи на наш штамм A/1377-Amer, который выделен в Восточноазиатском регионе и филогенетически связан (по сегментам PB1, PB2, PA и MP) с вариантами AIV, которые были в основном выделены в Японии. В зависимости от штамма генного сегмента A/1017 относится к различным сибирским штаммам, рассматриваемым в данной работе, что позволяет предположить, что AIV, обладающие этими генами, могут распространяться перелетными птицами, которые проходят через эти районы вдоль Восточно-Африканского, Западно-Азиатского или Центрально-Азиатского пролетного пути.

Таким образом, исследования целого ряда штаммов доказывают наличие гетерологичного генного пула у вирусов гриппа птиц Каспийского региона.

2.2.5.7 Заключение по разделу «Молекулярно-биологический и филогенетический анализ сегментов внутренних белков»

В целом, в результате этого этапа работы был проведен анализ сегментов внутренних белков, которые не играют роли в качестве поверхностных антигенов и являются более консервативными по сравнению с сегментами HA и NA. Обнаружены различные филогенетические паттерны, однако показана принадлежность сегментов к классическим евразийским вариантам сегментов вирусов диких птиц (Eurasian Avian-like). Следующим этапом являлось детальное молекулярно-биологическое и филогенетическое исследование штаммов редких субтипов, к которым в данном исследовании были отнесены штаммы H7N3, H10N5 и H12N5. Выбор обусловлен критерием новизны, так как по данным литературы и международных баз данных они являются менее изученными и могут представлять вирусы из альтернативных резервуаров (птиц различных экологических и таксономических групп). Для них проведен дополнительный филогенетический анализ сегментов поверхностных гликопротеинов и молекулярно-биологических маркеров. Штаммы наиболее

распространенных в популяциях диких птиц H1N1, H3N8, H4N6 были исключены из этой задачи. Для таких штаммов есть более обширная доступная информация в литературе и международных базах данных. Исследование филогенетических характеристик и потенциальных молекулярных маркеров биологических свойств является предметом будущих исследований.

2.2.6 Биологические свойства и генетическая характеристика низкопатогенных вирусов гриппа H7N3 субтипа

Вирус гриппа H7Nx субтипов является актуальным для ветеринарии и здравоохранения, так как вызывает эпизоотии среди домашних птиц, а также может вызвать летальные случаи заболевания человека. На западном побережье Среднего Каспия нами было выделено два новых вируса H7N3 – субтипа от двух особей кряквы обыкновенной: A/mallard/Dagestan/1050/2018(H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018(H7N3). Хотя прикаспийские водно-болотные угодья являются местами гнездования, зимовки и остановки большого числа мигрирующих водоплавающих птиц, согласно имеющейся литературе, изоляция подтипа H7 AIV, по-видимому, является довольно редким событием в Каспийском регионе в частности, и в России в целом. В настоящем исследовании целью работы было определить его генетические свойства и патогенный потенциал для человека и животных.

2.2.6.1 Патогенность вирусов гриппа H7N3 субтипа для кур и мышей

Внутривенный тест на индекс патогенности (IVPI) для штаммов вируса гриппа H7N3 субтипа A/mallard/Dagestan/1050/2018 и A/mallard/Dagestan/1051/2018 проводили, как описано в Руководстве ВОАН (ВОАН, 2018; I.P. Mo et al., 1997). Во время теста IVPI у цыплят, зараженных двумя вирусами H7, не наблюдалось никаких изменений в поведении или проявлений болезни. Оба изолята имели показатели IVPI 0 и не были патогенными для цыплят (ВОАН, 2018).

Чтобы оценить способность к репликации вирусов A/mallard/Dagestan/1050/2018 и A/mallard/Dagestan/1051/2018 у мышей, сорок

6 недельных мышей BALB/c были разделены на две группы, экспериментальную и контрольную, по 20 мышей в каждой. Животных из каждой группы анестезировали и интраназально инокулировали 10^6 эмбриональными инфекционными дозами (EID₅₀) вируса в 50 мкл аллантоисной жидкости. Группе мышей отрицательного контроля (n = 20) интраназально вводили 50 мкл PBS. Мышей взвешивали и наблюдали ежедневно в течение 14 дней после заражения (d.p.i.). Трех мышей из каждой экспериментальной группы подвергали эвтаназии 3, 5, 7 и 10 дней в сутки, и образцы легочной ткани собирали в асептических условиях для титрования вируса.

На 21 день оставшиеся животные были подвергнуты эвтаназии, были собраны образцы крови и получена сыворотка. Образцы сыворотки были протестированы с помощью ИИ-анализа на выявление антител к вирусам A/mallard/Dagestan/1050/2018 и A/mallard/Dagestan/1051/2018.

Мы оценили патогенность вирусов A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3) у 6-недельных мышей BALB/c. В обеих группах мыши не теряли в весе и не проявляли других признаков заболевания. Активная репликация в легких не наблюдалась ни с помощью ПЦР, ни при заражении клеток MDCK. На 21 день после введения были взяты сыворотки и определены титры РТГА. Эти результаты свидетельствуют о том, что оба вируса подтипа H7N3 непатогенны для мышей и не реплицируются эффективно в легких мышей. В то же время штаммы проявляют антигенные свойства на моделях мышей.

2.2.6.2 Молекулярно-биологический анализ вирусов гриппа H7N3 субтипа

Были определены полногеномные нуклеотидные последовательности для вирусов и депонированы в международную базу GISAID под следующими номерами: EPI_ISL_331289 для A/mallard/Dagestan/1050/2018; EPI_ISL_331290 для A/mallard/Dagestan/1051/2018.

Молекулярная характеристика аминокислотных последовательностей была проведена для оценки наличия генетических маркеров, потенциально

влияющих на биологические характеристики A/mallard/Dagestan/1050/2018 и A/mallard/Dagestan/1051/2018. Экспериментально подтвержденные маркеры, которые, как известно, связаны с патогенностью AIV, адаптацией хозяина (например, связыванием с рецептором и репликативной способностью) и передачей, были протестированы, как описано Suttie et al. (A. Suttie et al., 2019) и Manz et al. (B. Manz et al., 2013). Последовательности, исследованные в этом исследовании, сначала были выровнены с выбранными последовательностями, доступными в GISAID, с использованием программы CLUSTAL_X (J.D. Thompson et al., 1997), а затем отредактированы с помощью BioEdit 7.05 (T.A. Hall et al., 1999). Гены NA и M2 изолятов H7N3 также были проверены, как описано ранее, на наличие известных мутаций, связанных с устойчивостью к ингибиторам нейраминидазы и адамантанам (M.S. Song et al., 2015; L.V. Gubareva et al., 2006).

Структура сайта расщепления HA обоих штаммов H7N3 показала отсутствие основных аминокислот, что указывает на то, что эти вирусы несут маркеры низкой патогенности в аминокислотных последовательностях (PELPKGR/GLF) (таблица 6). Аминокислотный состав сайтов связывания рецепторов в белках HA свидетельствовал о предпочтении α 2,3-связанных рецепторов сиаловой кислоты, которые преобладают у видов птиц (таблица 6).

Оба штамма имели полноразмерный ген NA; не наблюдалось аминокислотной делеции стеблевой области белка NA, связанной с адаптацией H7 к домашней птице (Mulatti P. et al., 2016; L. Campitelli et al., 2004). У изолятов H7 не наблюдалось мутаций, связанных с устойчивостью к ингибиторам нейраминидазы и адамантанам — в генах NA и M2 соответственно, что указывает на их восприимчивость к этим препаратам. В целом, активные сайты сиалидазы N3 были сохранены; никаких изменений в каталитической (нумерация R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 и Y406–N2) и в структурной (нумерация E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, H274, E277, N294 и E425–N2) областях обнаружено не было.

Таблица 6 – Аминокислотный состав сайта разрезания HA и района рецептор-связывающего сайта HA штаммов A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3)

Штамм	Сайт разрезания HA (аминокислоты 333-342)	Левый край участка связывания с рецептором (аминокислоты 229-238)	Правый край участка связывания с рецептором (аминокислоты 142-146)	Рецептор-связывающий сайт					
				106	162	192	199	202	203
A/mallard/Dagestan/1050/2018	PELPKGRGLF	RPQVNGQSGR	GATSA	Y	L	H	E	K	L
A/mallard/Dagestan/1051/2018	PELPKGRGLF	RPQVNGQSGR	GATSA	Y	L	H	E	K	L

Ни один из двух проанализированных штаммов H7 не содержал аминокислотной замены во внутренних генах, которые, как известно, обеспечивают адаптацию AIV к млекопитающим хозяевам, таким как E627K и D701N в PB2, ни специфических мутаций в остатке 66 в PB1-F2 (A. Suttie et al., 2019). В частности, не наблюдалось делеции внутри или в С-концевой области генов NS1, и оба штамма H7 имели аминокислотный мотив ESEV в С-концевой области этого белка, что типично для вирусов птичьего гриппа.

Нуклеотидные последовательности A/mallard/Dagestan/1050/2018 и A/mallard/Dagestan/1051/2018 были очень похожи при сравнении друг с другом, показывая процент идентичности 100,0% (сегменты генов PB2, PB1, NA и M), 99,9% (PA, HA, NP сегменты генов) и 99,7% (сегмент гена NS). Как показано в таблице 5, географическое распределение результатов BLAST позволяет предположить, что родственный AIV произошел в Азии (HA, PB1), Африке (NA, MP, NP) и Европе (PB2) или имел различное географическое происхождение и/или происхождение хозяина (PA, NS).

2.2.6.3 Филогенетический анализ вирусов гриппа H7N3 субтипа

Чтобы лучше понять эволюционные взаимосвязи между новыми штаммом H7N3 и другими штаммами AIV, были построены и проанализированы филогении максимального правдоподобия (ML).

Для этого были включены последовательности, полученные BLAST анализом из базы, а также включены последовательности референс-штаммов,

выявленных в ходе анализа доступной литературы (таблица 7).
 Филогенетическое дерево сегмента НА представлено на рисунке 23.

Таблица 7 – Референс-штаммы H7Nx, отобранные и включенные в филогенетический анализ

Референс-штамм	Номер полногеномной Последовательности GenBank/GISAID	Дата выделения	Страна	Сайт разрезания	Источник/ссылка
A/chicken/Chile/176822/02	EPI_ISL_3514	01.01.2002	Чили		(Y.L. Jones et al., 2004)
A/chicken/Chile/184240-1/02			Чили		(Y.L. Jones et al., 2004)
A/Chicken/Murree/ NARC-01/1995	FJ577510 FJ577512 FJ577514 FJ577511 FJ577513 FJ577515 FJ577517 FJ577516		Пакистан	PETPKRRK/R	(M.A. Abbas et al., 2010)
A/Chicken/Chakwal/ NARC-35/2001	FJ577518 FJ577520 FJ577522 FJ577519 FJ577521 FJ577523 FJ577525 FJ577524		Пакистан	PEIPKG/R	(M.A. Abbas et al., 2010)
A/Chickem/Karachi/ NARC-23/2003	FJ577526 FJ577528 FJ577530 FJ577527 FJ577529 FJ577531 FJ577533 FJ577532		Пакистан	PETPKRRK/R	(M.A. Abbas et al., 2010)
A/Chicken/Chakwal/ NARC-148/2004	FJ577550 FJ577552 FJ577554 FJ577551 FJ577553 FJ577555 FJ577557 FJ577556		Пакистан	PETPKRRK/R	(M.A. Abbas et al., 2010)
A/duck/Cambodia/b0116502/2017	EPI_ISL_295522	12.01.2017	Камбоджа	PEPPKGR/GLF	A. Suttie et al., 2019)
A/ck/Guanajuato/07437-15/2015(H7N3)	KR821169	11.03.2015	Мексика	...PENPK-DRKSRHRRT R/GLF...	(N.S. Trovão et al., 2020)
A/Spot-billed duck/South Korea/WKU2019-1/2019 (H7N3)	EPI_ISL_706194	15.03.2019	Корея	PQIEPR/GLF	(T.T.T. Trinh et al., 2021)
A/turkey/North Carolina/20–007948–003/2020(H7N3)	MT444191 MT444192 MT444193 MT444194 MT444195 MT444196 MT444197 MT444198	10.03.2020	США		(S. Youk et al., 2020)
A/chicken/Coahuila/CPA-03045-22/2022	OP535168 OP535169 OP535170 OP535171 OP535172 OP535173 OP535174 OP535175	21.04.2022	Мексика	PENPKSRKS QHRKTR/G	(R. Navarro-Lopez et al., 2022)
A/teal/Egypt/MB-D-487OP/2016	MN208010 MN208011 MN208012 MN208013 MN208014 MN208015 MN208016 MN208017	28.01.2016	Египет	333PELPK-GRGLF342	(A.E. Kayed et al., 2023)

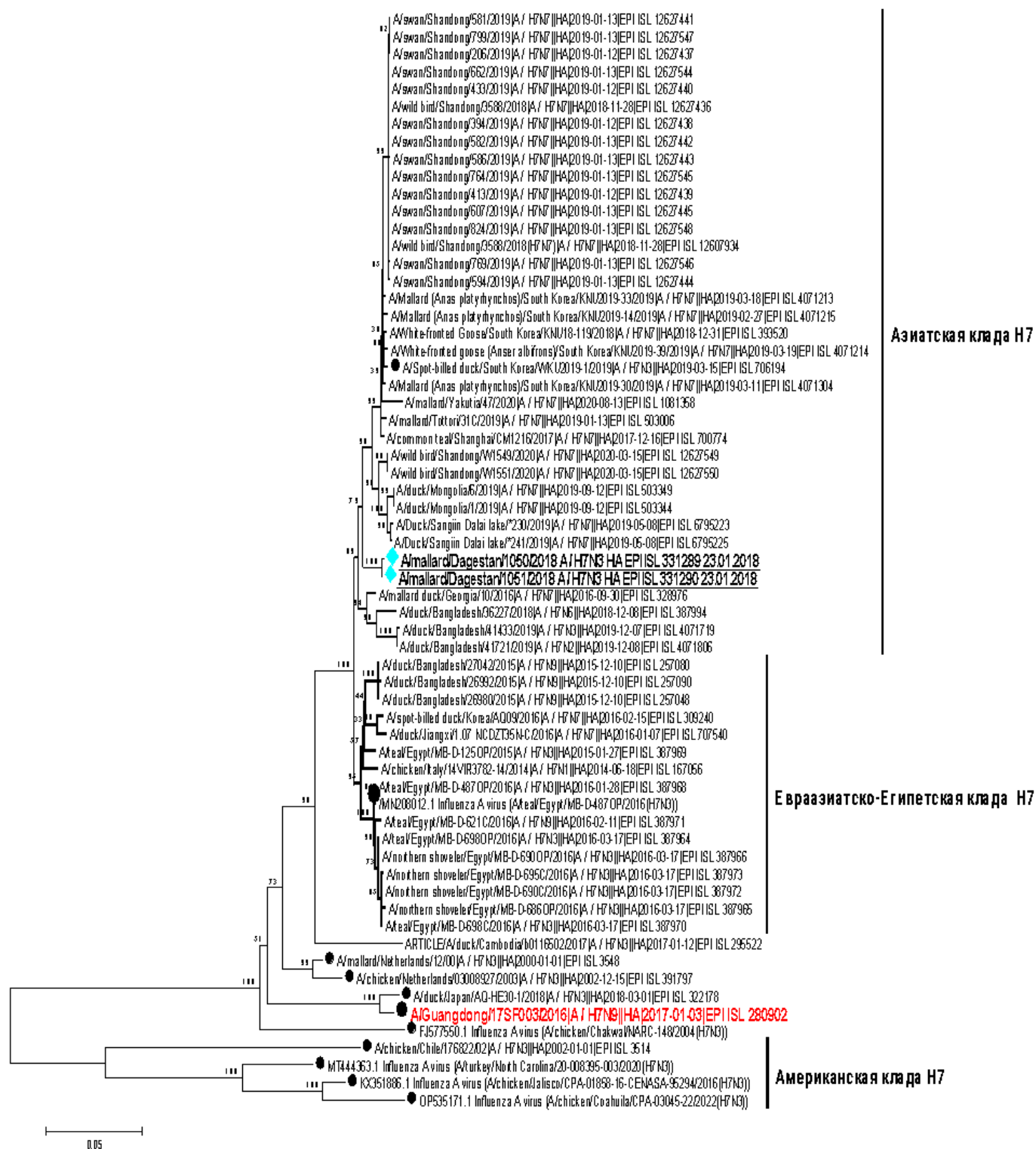


Рисунок 23 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома НА вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечены штаммы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс-штаммы отмечены черным кругом, зоонозный штамм выделен красным. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

Штаммы принадлежат азиатской кладе H7 вирусов, формируя отдельную ветвь. Наиболее филогеннетически близкими являются штаммы из Монголии и Китая.

Отдельной кладой выделяются вирусы Евроазиатско-Египетской группы, эндемичных для Северной Африки (А. Е. Kayed et al., 2023). Другие референс штаммы вирусов гриппа H7 субтипа, включая зоонозный вариант вируса H7N9-субтипа от человека (Т. Tanikawa et al., 2019), принадлежат достоверно отличнымкладам. Обособлена американскаяклада, включающая все американские референс-штаммы.

Филогенетическое дерево сегмента NA (N3) представлено на рисунке 24.

Штаммы, выделенные в ходе исследования, принадлежат большой евроазиатской кладе N3 вирусов, и лежат в одной субкладе с южно-корейским референс-штаммом H7N3, выделенным от черной кряквы в 2019 году.

В этой же кладе лежит группа эндемичных египетских вирусов H7N3 (референс-штамм A/teal/Egypt/MB-D-487OP/2016 (H7N3)). Интересно, что достоверно отличающейся кладой на дерево является группа европейских штаммов, включая западную часть Каспийского региона.

Другие референс штаммы вирусов гриппа H7 субтипа, принадлежат достоверно отличнымкладам. Обособлена американскаяклада, включающая все американские референс-штаммы.

Исследованные штаммы принадлежат большой евразийской кладе вирусов по РА сегменту (рисунок 25), включающей очень разные варианты. Достоверность топологии не позволяет однозначно выделить какие-либо специфичные группы для данных штаммов, хотя из референс-штаммов наиболее близки также египетские и корейские H7N3. Другие референс штаммы вирусов гриппа H7 субтипа, включая зоонозный вариант вируса H7N9-субтипа от человека (CDC, 2013), принадлежат достоверно отличнымкладам. Обособлена американскаяклада, включающая все американские референс-штаммы.

Филогенетическое дерево сегмента NP представлено на рисунке 26.

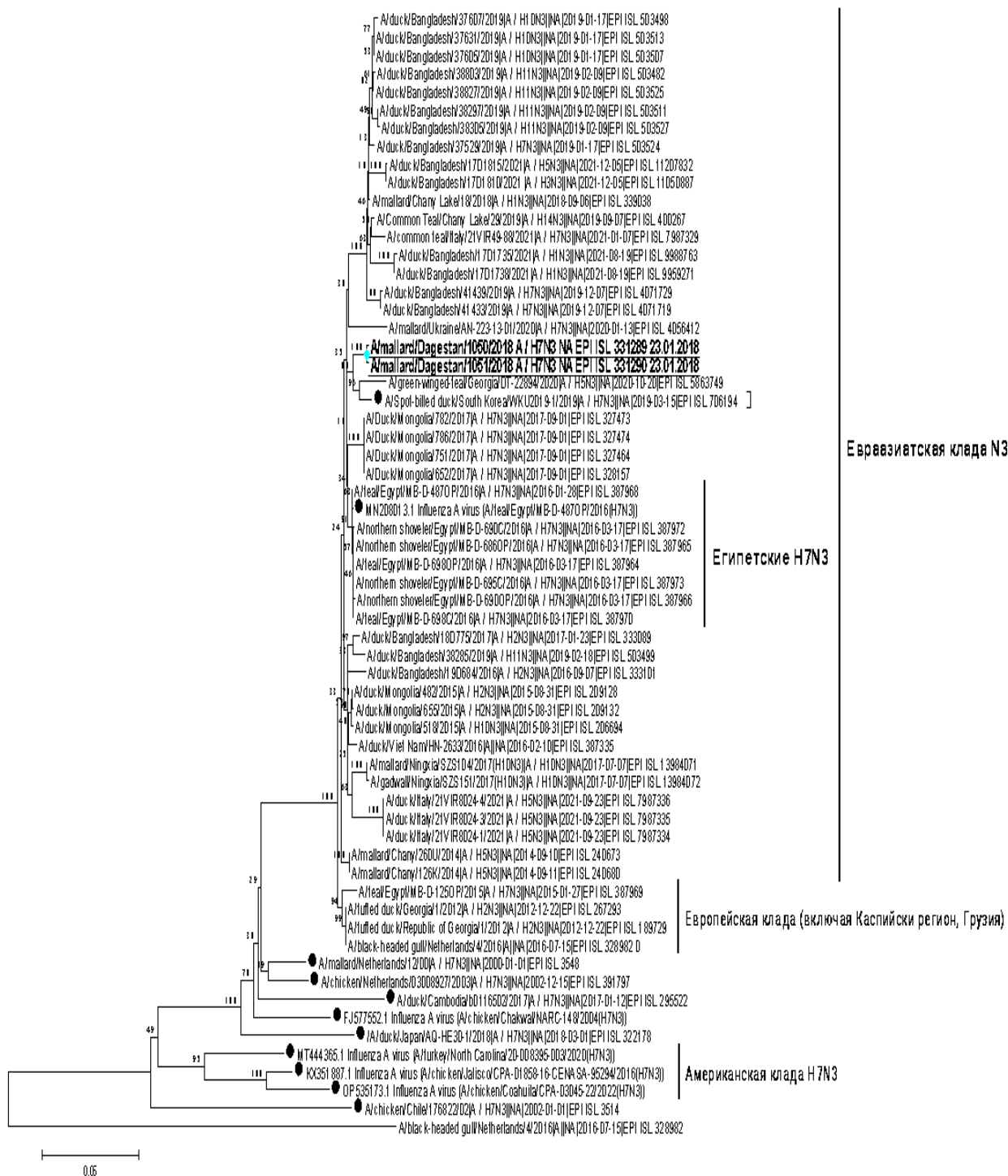


Рисунок 24 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома NA (N3) вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечены штаммы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс-штаммы отмечены черным кругом

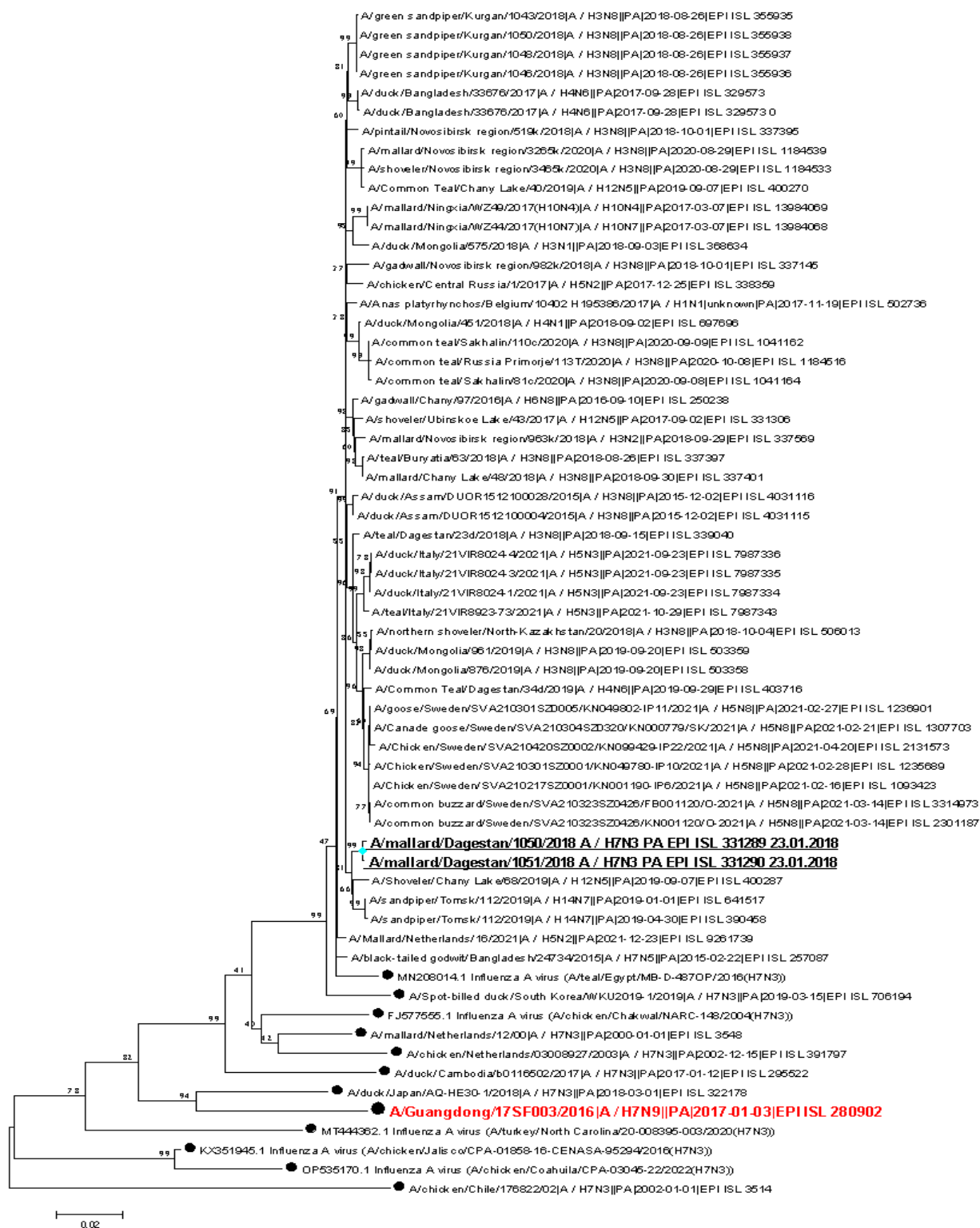


Рисунок 25 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома РА вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечены штаммы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс-штаммы отмечены черным кругом, зоонозный штамм выделен красным

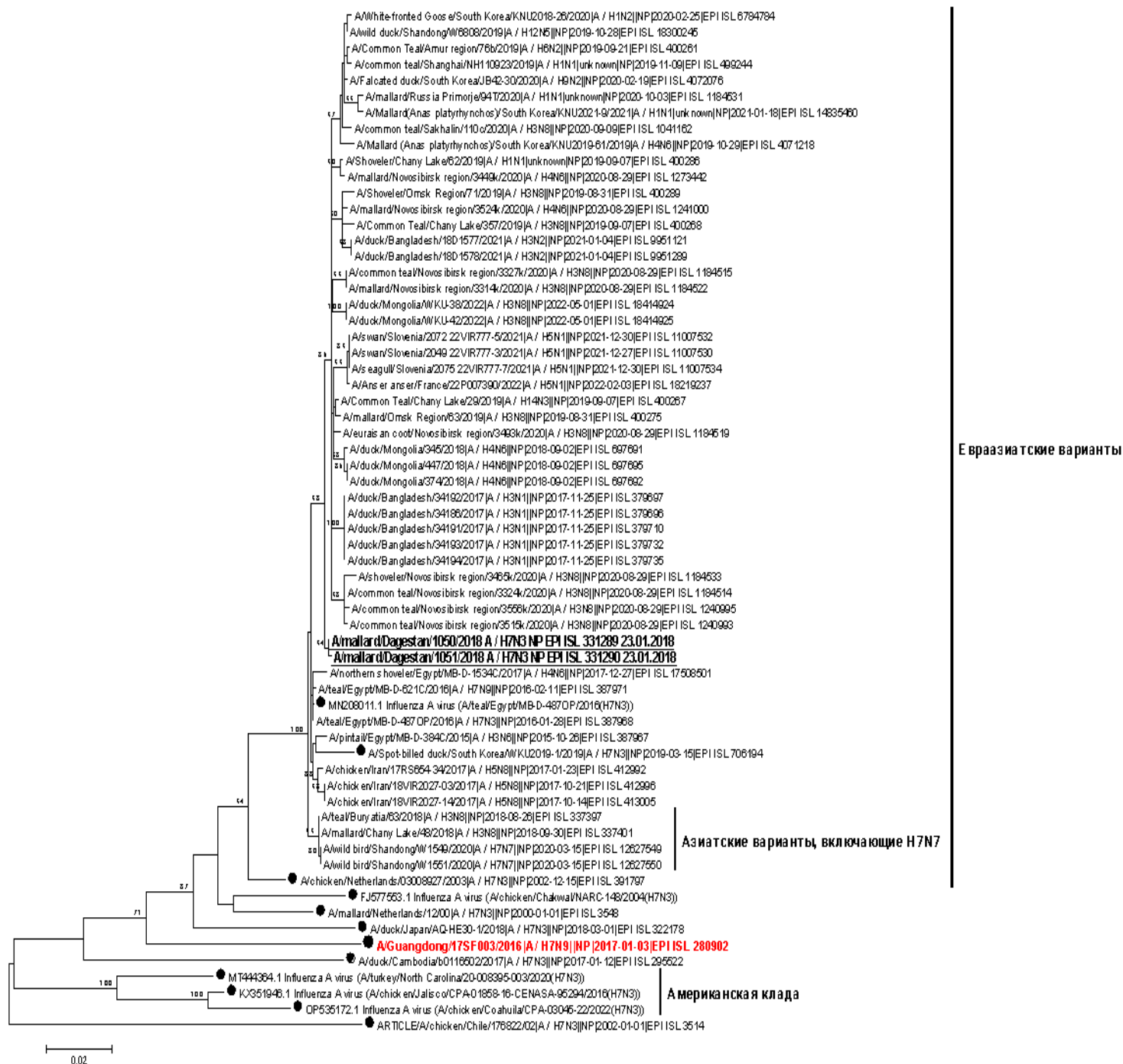


Рисунок 26 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома NP вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечены штаммы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс-штаммы отмечены черным кругом, зоонозный штамм выделен красным.

Филогенетическое дерево сегмента NS представлено на рисунке 27.

Исследованные штаммы принадлежат большой евразийской кладе вирусов аллеля А, что согласуется с филогенетическим анализом сегмента NS (раздел 3.5.6). Примечательно, что все референс-штаммы американского континента и большинство евразийских референс-штаммов вирусов гриппа Н7 субтипа, включая зоонозный вариант вируса Н7Н9-субтипа от человека (Т. Tanikawa et al., 2019), также принадлежат аллелю А. К аллелю В относятся три из анализируемых референс-штаммов: Нидерланды, Камбоджа и Япония.

Филогенетическое дерево сегмента PB2 представлено на рисунке 28.

Исследованные штаммы принадлежат большой евразийской кладе вирусов по PB2 сегменту, включающей очень разные варианты. Достоверность топологии не позволяет однозначно выделить какие-либо специфичные группы для данных штаммов. Из референс-штаммов ни один достоверно не кластеризуется с изучаемыми штаммами. Все референс штаммы вирусов гриппа Н7 субтипа, включая зоонозный вариант вируса Н7Н9-субтипа от человека (Т. Tanikawa et al., 2019) принадлежат достоверно отличным кладам. Обособлена американская клада, включающая все американские референс-штаммы.

Филогенетическое дерево сегмента PB1 представлено на рисунке 29.

Исследованные штаммы принадлежат большой евразийской кладе низкопатогенных вирусов по PB1 сегменту, включающей очень разные варианты. Достоверность топологии не позволяет однозначно выделить какие-либо специфичные группы для данных штаммов, хотя из референс-штаммов наиболее близкий египетский лежит в специфичной субкладе египетских штаммов Н7Н3. Другие референс штаммы вирусов гриппа Н7 субтипа, включая зоонозный вариант вируса Н7Н9-субтипа от человека (Т. Tanikawa et al., 2019), принадлежат достоверно отличным кладам. Обособлена американская клада, включающая все американские референс-штаммы.

Филогенетическое дерево сегмента MP представлено на рисунке 30.

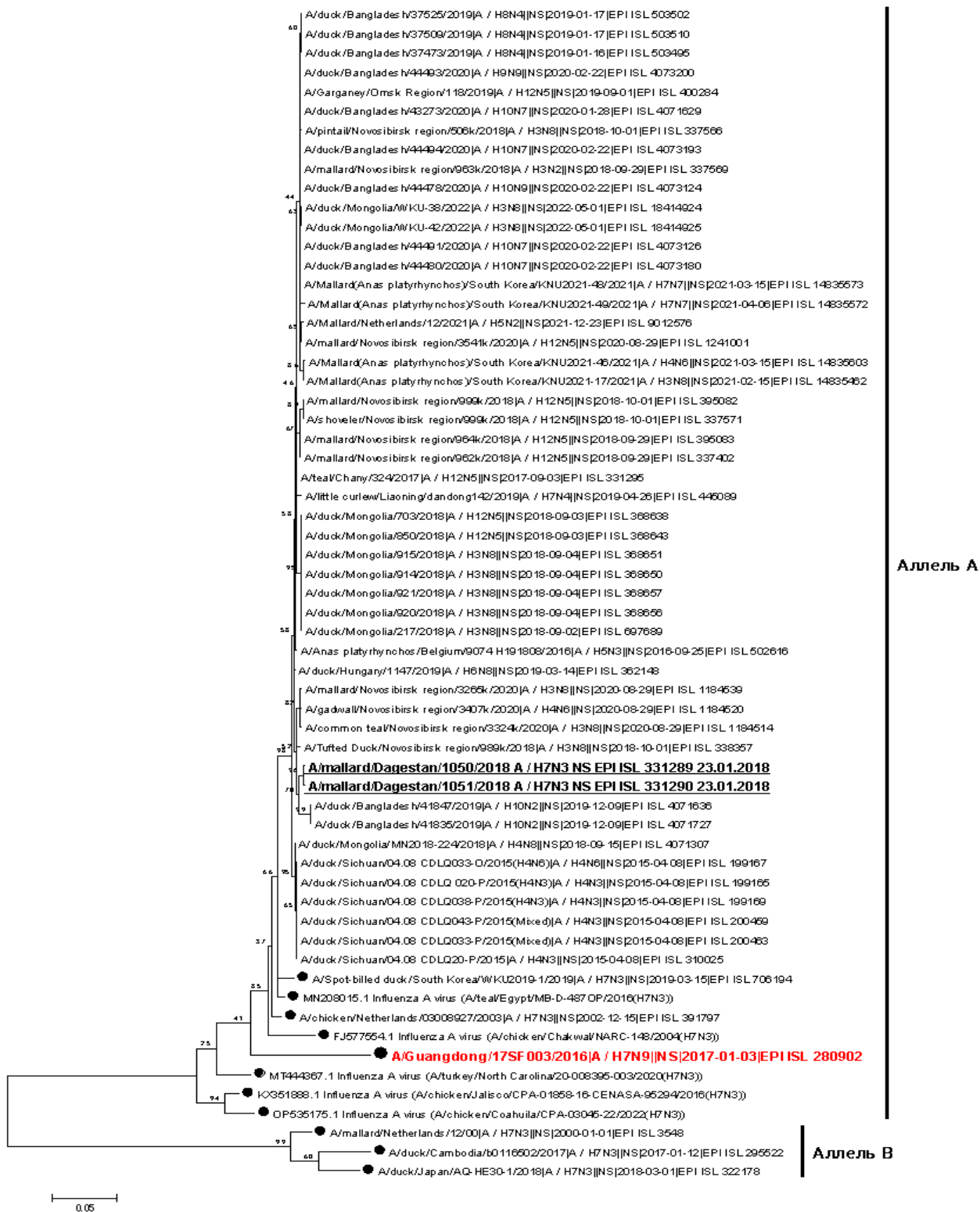


Рисунок 27 – Филогенетическая дендрогамма нуклеотидных последовательностей сегмента генома NS вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрогаммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечены штаммы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс-штаммы отмечены черным кругом, зоонозный штамм выделен красным

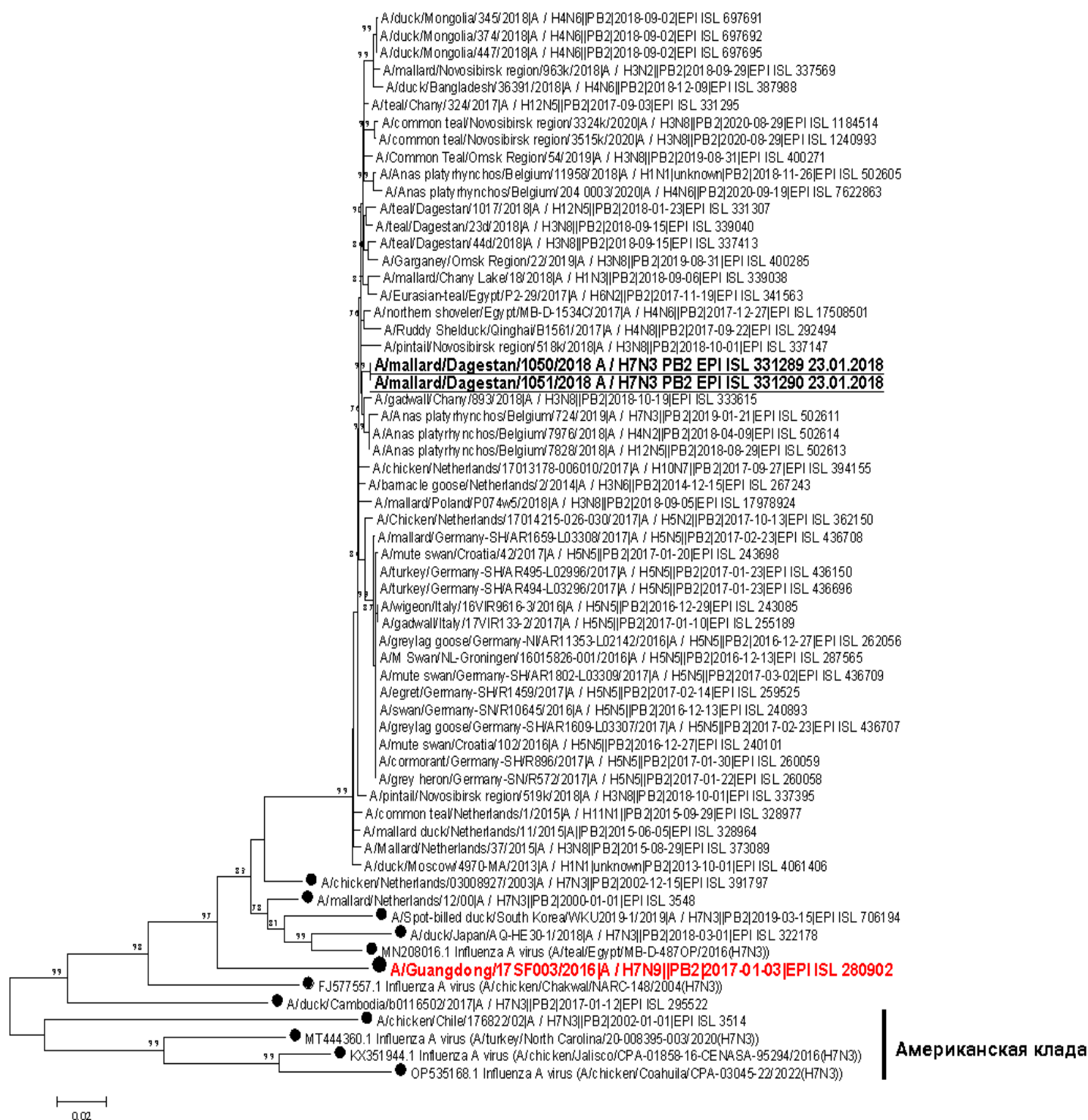


Рисунок 28 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома PB2 вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечены штаммы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс-штаммы отмечены черным кругом, зоонозный штамм выделен красным

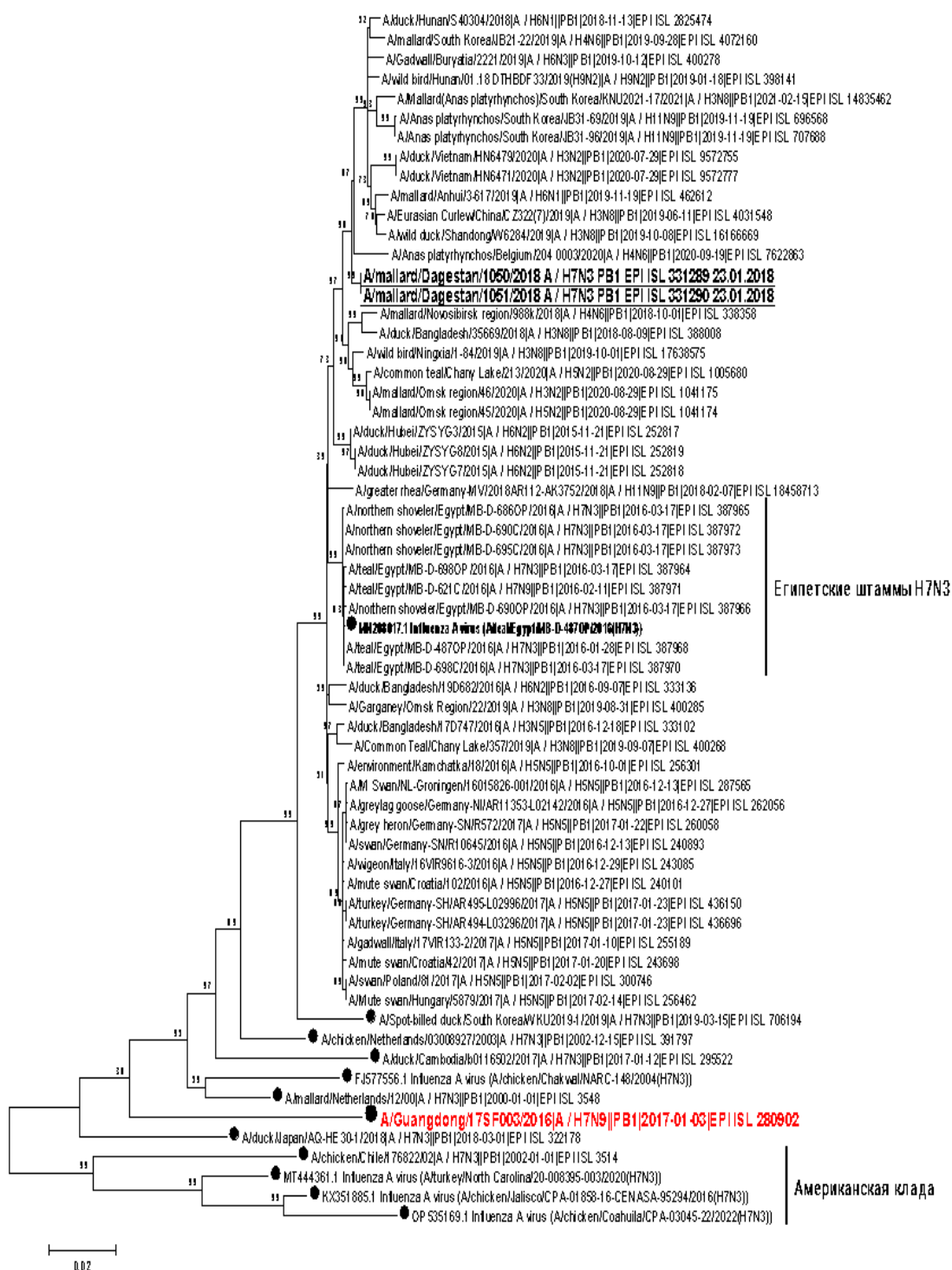


Рисунок 29 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома PB1 вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечены штаммы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс-штаммы отмечены черным кругом, зоонозный штамм выделен красным

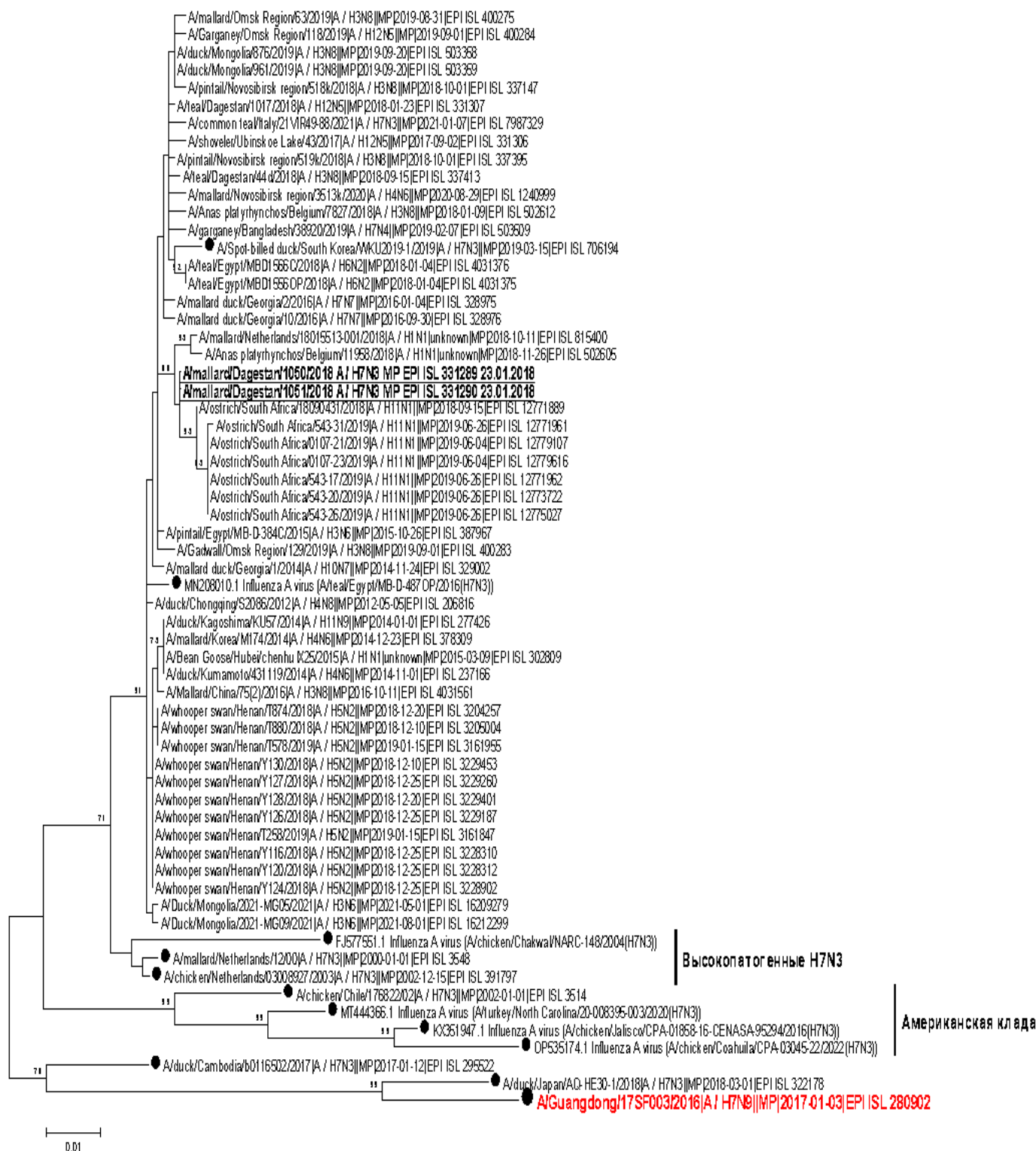


Рисунок 30 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома МР вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечены штаммы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс-штаммы отмечены черным кругом, зоонозный штамм выделен красным

По МР сегменту штаммы относятся к кладе низкопатогенных классических вирусов гриппа птиц, наиболее близким является корейский референс-штамм. Характерно достоверное выделение высокопатогенных вирусов H7N3 субтипов, а также МР сегментов американских вирусов гриппа птиц. Ожидаемо характерное отличие сегмента МР человеческого зоонозного вируса гриппа А/H7N9.

2.2.6.4 Заключение по филогенетическому анализу каспийских штаммов H7N3

В целом, филогенетический анализ показал, что сегменты H7N3 географически сгруппированы с азиатскими (НА, PB1, PA, NS), африканскими (MP, NA, NP) и европейскими (PB2) линиями AIV. Внутренние сегменты генов вируса H7N3 AIV также кластеризовались с циркулирующими LPAI по всей Евразии, включая, например, Индийский субконтинент, о чем свидетельствуют тесные филогенетические взаимосвязи генов полимеразы (PB2, PB1 и PA) и NS, MP и NP с LPAI, выделенными дикими и домашними утками в Бангладеш. Интересно, что внутренние гены PB2, PB1, PA и NP вирусов H7N3 также показали тесную взаимосвязь с генами высокопатогенных AIV (HPAIV) H5N8, H5N6 и H5N5 из евразийских линий (клада H5 2.3.4.4b). Это указывает на то, что вирусы H7N3 в этом исследовании имели общий внутренний генофонд вирусных сегментов, обнаруженных как в LPAI, так и в HPAI в Евразии, что указывает на склонность к разнообразной реассортации в резервуарах-хозяевах.

Примечательно, что за исключением штаммов A/teal/Egypt/MB-D-487OP/2016 (H7N3) и A/Spot-billed duck/South Korea/WKU2019-1/2019, все остальные штаммы не имеют достоверной кластеризации с изучаемыми штаммами.

Включая зоонозный вариант вируса H7N9-субтипа от человека (T. Tanikawa et al., 2019), они принадлежат достоверно отличным кладам, которые являются специфичными по географическим территориям и фенотипу вируса. Обособлена американская клада, включающая все американские референс-штаммы.

Хронология выделения всех взятых в анализ последовательностей, указывает на то, что изучаемые штаммы H7N3 могли циркулировать более двух десятилетий в птичьих резервуарах Евразии, что подчеркивает сохранение этого подтипа в популяциях диких птиц.

2.2.7 Биологические свойства и генетическая характеристика низкопатогенных вирусов гриппа H10N5 субтипа

2.2.7.1 Основные вирусологические характеристики штамма A/mallard/Dagestan/1051/2018

Пандемический потенциал новых вирусов птичьего гриппа, таких как птичьи штаммы H10N7 и H10N8, которым недавно удалось преодолеть видовой барьер от птиц к человеку, всегда вызывает серьезную озабоченность, поскольку маловероятно, что у нас будет какой-либо предшествующий иммунитет. Человеческие и птичьи изоляты вируса гриппа H10-субтипа демонстрируют способность быстро адаптироваться к репликации в организме млекопитающих. К счастью, до сих пор нет доказательств эффективной передачи какого-либо вируса гриппа птиц от человека к человеку (E.K. Schneider et al., 2017).

В данном исследовании был обнаружен вирус гриппа H10N5-субтипа и оценили его основные биологические и генетические свойства, позволяющие судить, может ли этот вариант H10-субтипа представлять опасность для сельского хозяйства и здравоохранения.

Биологические свойства представлены в общей главе 3.4.1 и позволяют сделать вывод о незначительном патогенном потенциале выделенного штамма H10N5-субтипа. Штамм имеет стандартную активность в культуре клеток MDCK, показывая титр сравнимый с таковыми для низкопатогенных вирусов гриппа птиц. Штамм имеет индекс IVPI равный 0. При проверке сывороток крови зараженных кур значимых титров антител в РТГА не обнаружено.

2.2.7.2 Молекулярно-биологический и филогенетический анализ штамма A/mallard/Dagestan/1051/2018 вируса гриппа H10N5 субтипа

Была определена полногеномная нуклеотидная последовательность для вируса и задепонирована в международную базу GISAID под следующим номером: EPI_ISL_18794371.

Молекулярная характеристика аминокислотных последовательностей была проведена для оценки наличия генетических маркеров, потенциально влияющих на биологические характеристики A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H10N5).

Структура сайта расщепления HA показала отсутствие многоосновных аминокислот, что указывает на то, что эти вирусы несут маркеры низкой патогенности в аминокислотных последовательностях (PELPKGR/GLF). Аминокислотный состав сайта связывания рецептора оказался RPQVNGQSGR (229-238) указывая на предпочтение α 2,3-связанных рецепторов сиаловой кислоты, которые преобладают у видов птиц. Не содержал аминокислотной замены во внутренних генах, которые, как известно, обеспечивают адаптацию AIV к хозяевам млекопитающих, таким как E627K и D701N в PB2, ни специфических мутаций в остатке 66 в PB1-F2 (Т.А. Тимофеева и др., 2021). В частности, не наблюдалось делеции внутри или в С-концевой области генов NS1, и штамм H10 имел аминокислотный мотив ESEV в С-концевой области этого белка, что типично для вирусов птичьего гриппа.

Как было показано ранее в таблице 5, географическое распределение результатов BLAST позволяет предположить, что родственный AIV произошел в Азии (HA, NA, MP, NP, PA, NS) и Африке и Ближнем Востоке. (PB2, PB1) или имел различное географическое происхождение и/или происхождение хозяина.

Чтобы лучше понять эволюционные взаимосвязи между новым штаммом H10N3 и другими штаммами AIV, были построены и проанализированы филогении максимального правдоподобия (ML).

Для этого были включены последовательности, полученные BLAST анализом из базы, а также включены последовательности референс-штаммов, выявленных в ходе анализа доступной литературы (таблица 8).

Филогенетическое дерево сегмента НА представлено на рисунке 31. Филогенетическая группа, в которую входит последовательность сегмента НА исследуемого штамма образована штаммами, собранными в Европейской части Евразии, за исключением одного вируса из Египта и двух вирусов из Новосибирской области. Как раз с ним и образует подгруппу исследуемый штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5). Водно-болотные угодья Юга западной Сибири являются основным ареалом гнездования. Это может объяснить генетическую близость образцов в данной филогенетической группе. Также, в эту Европейскую кладу входит референс – штамм A/Seal/Sweden/SVA0546/2014. Референс – штамм из Бангладеш показывает свое родство с другими образцами из данной территории. Другой референс – штаммы, выделенные в Китае, включая зоонозный H10N8 от человека, образуют группы также с Китайскими образцами.

Филогенетическое дерево сегмента NA представлено на рисунке 32. По сегменту NA штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5) не образует какую – либо кладу, которая бы имела достоверную поддержку ветвей. Интересно отметить филогенетическую группу, которая образована штаммами вируса гриппа А, имеющими субтип H12N5.

В нее входит подгруппа с образцами субтипа H5N5. Большинство штаммов в этой крупной филогенетической группе происходят с территории Сибири (Новосибирская область, Омская область, Бурятия). Среди результатов поиска наиболее идентичных последовательностей с помощью BLAST обнаруживается еще один штамм из Дагестана. Он входит в крупную кладу, где можно достоверно отличить филогенетическую подгруппу вирусов субтипа H9N5 из Азии, довольно крупную Европейскую подгруппу, а также подгруппу штаммов, имеющих субтип H12N5, в которую, собственно, и входит этот штамм. Филогенетическое дерево сегмента PA представлено на рисунке 33.

Таблица 8 – Референс-штаммы, отобранные и включенные в филогенетический анализ

Референс-штамм	Номер полногеномной Последовательности GenBank/GISAID	Дата выделения	Страна	Сайт разрезания	Источник/ссылка
A/swine/Hubei/10/2008/H10N5	JX500440, JX500441, JX500442, JX500443 JX500444, JX500445, JX500446, JX500447	21.11. 2012	Китай	IIQGR/GLF	(N. Wang et al., 2012)
A/duck/Shanghai/602/2009	KU921391(PB2); KU921394(PB1); KU921397(PA); KU921400(HA); KU921403 (NP); KU921406 (NA); KU921409 (M); KU921412 (NS)	Н.д.	Китай	-	(T. Zhang et al., 2017)
A/duck/Fujian/1761/2010	KU921392 (PB2); KU921395 (PB1); KU921398 (PA); KU921401 (HA); KU921404 (NP); KU921407 (NA); KU921410 (M); KU921413 (NS)	Н.д.	Китай	PEIMQGRGLFG	(T. Zhang et al., 2017)
A/duck/Shanxi/3180/2010	KU921393 (PB2); KU921396 (PB1); KU921399 (PA); KU921402 (HA); KU921405 (NP); KU921408 (NA); KU921411 (M); KU921414 (NS)	Н.д.	Китай	PEIMQGRGLFG	(T. Zhang et al., 2017)
A/Seal/Sweden/SVA0546/2014	EPI_ISL_167226	16.04. 2014	Sweden (Kattegat)		(R. Bodewes et al., 2016)
A/duck/Bangladesh/824/2009	MH071486, MH071502, MH071462, MH071452, MH071506, MH071496, MH071460, MH071473	Н.д.	Бангладеш	PELMQGR↓GLF	(R. El-Shesheny et al., 2018)
A/kentish plover/Hebei/QHD512/2013(H10N7)	EPI_ISL_13984062	26.04. 2013	Китай	PELMQGR↓GLFGAI	(X. Lv et al., 2023)
A/kentish plover/Liaoning/DD651/2020(H10N 9)	EPI_ISL_13985218	27.09. 2020	Китай	PEVVQGR↓GLFGAI	(X. Lv et al., 2023)
A/swan/Shandong/W4074/2020(H10 N4)	OM373291, OM373292, OM373293, OM373294 OM373295, OM373296, OM373297, OM373298	Н.д.	Китай	-	(Y. Wang et al., 2022)
A/duck/Zhejiang/S4034/2017(H10N 3)	EPI_ISL_15737452	30.10. 2017	Китай	-	(Y. Zhang. et al., 2014)

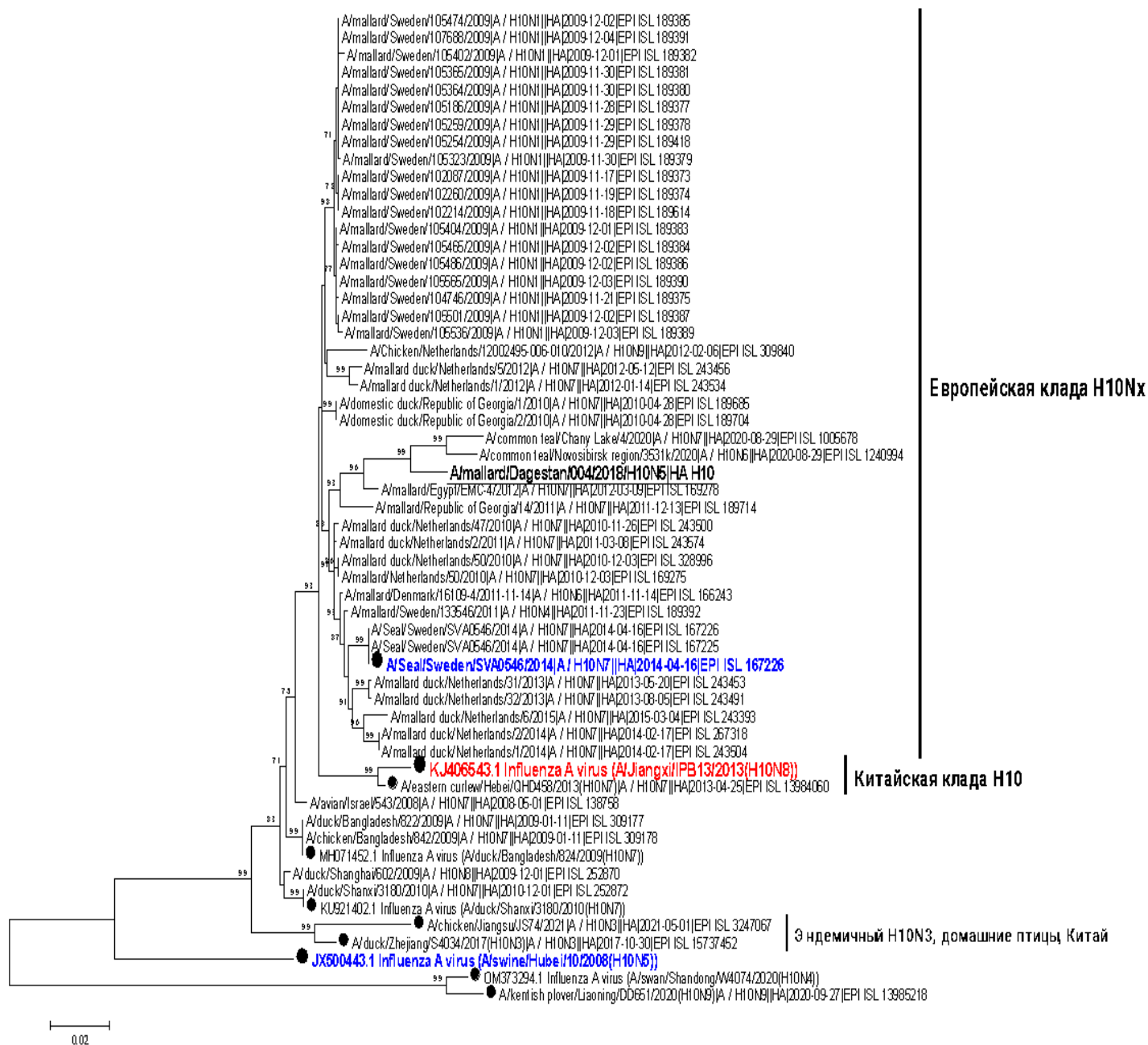


Рисунок 31 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома НА (H10) вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечен штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом; зоонозный штамм выделен красным; штаммы, выделенные от млекопитающих выделены синим. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

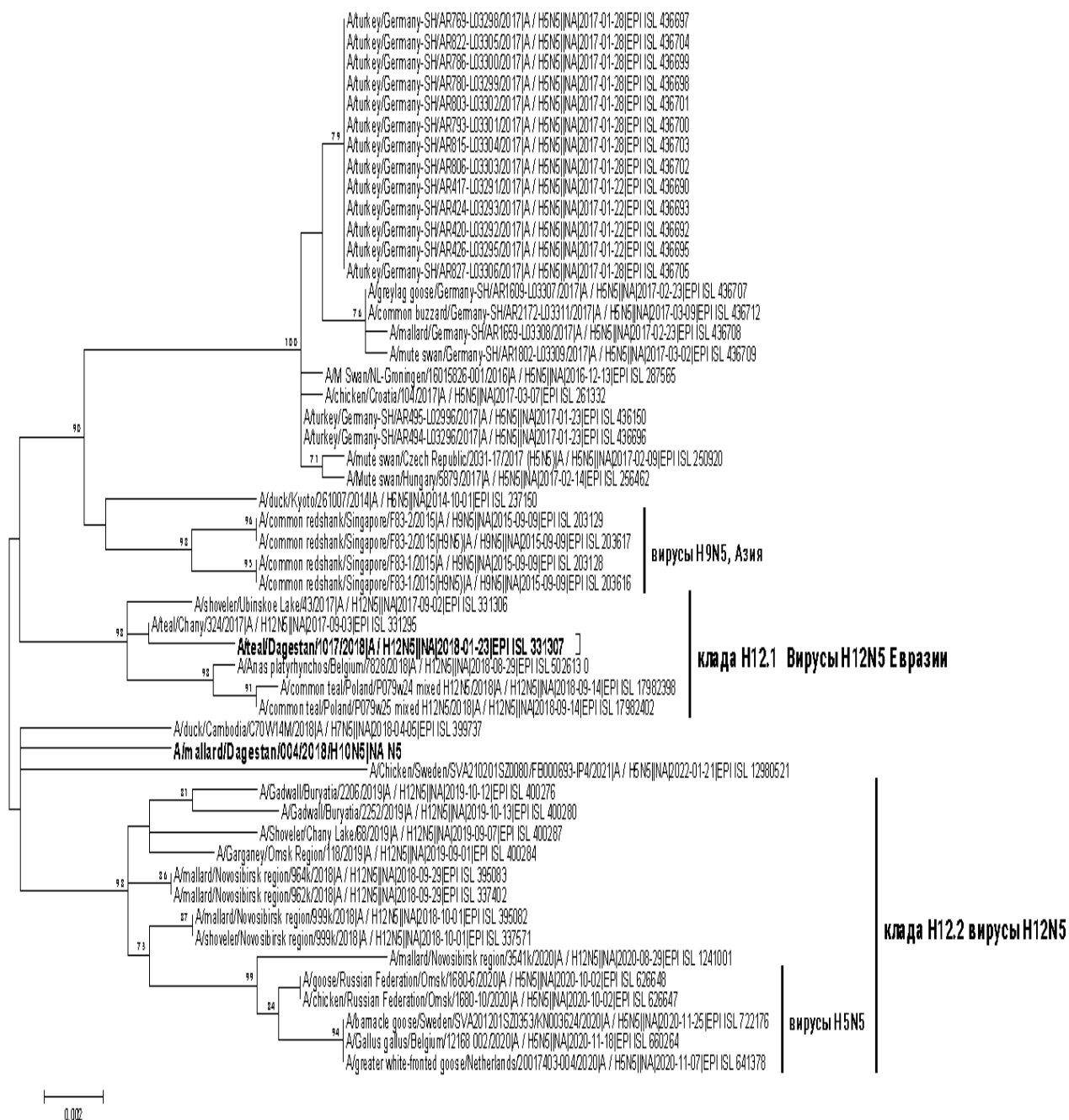
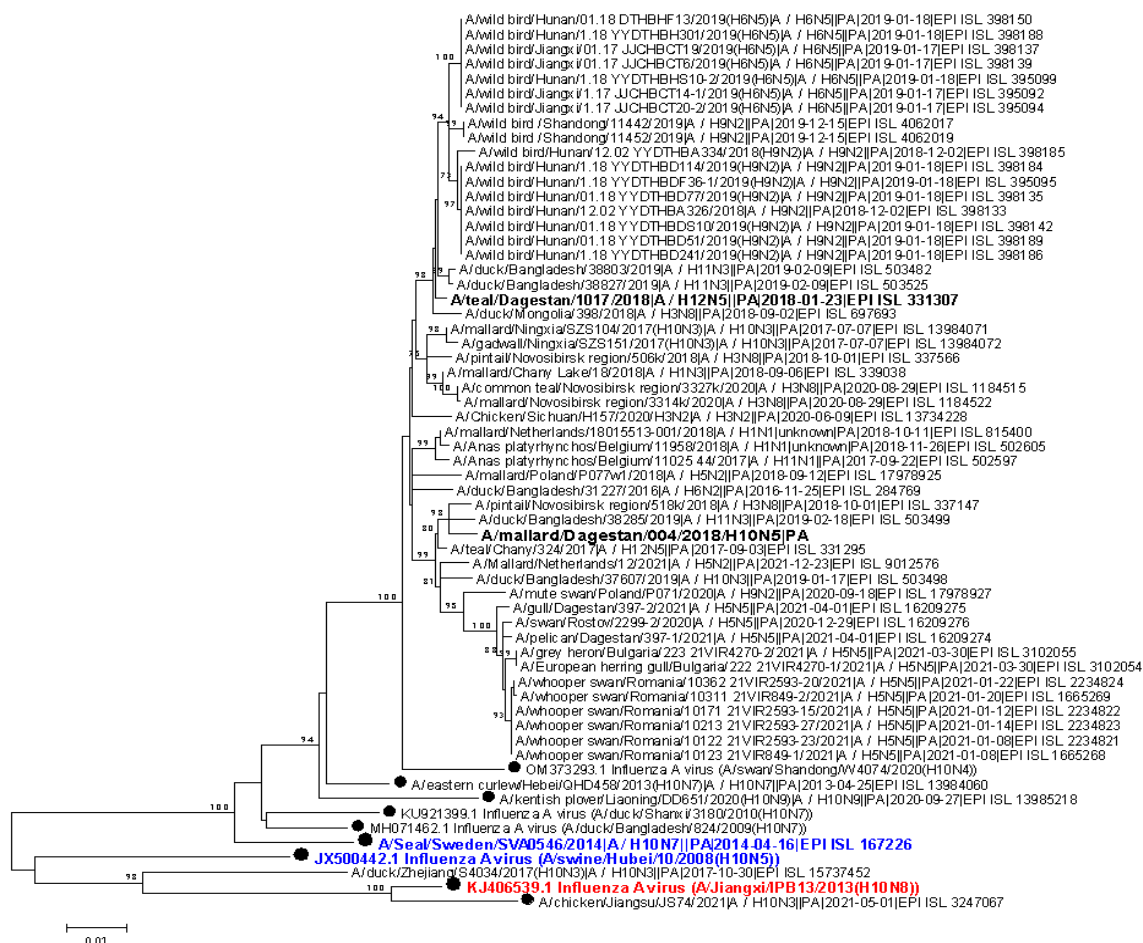


Рисунок 32 – Филогенетическая дендрогамма нуклеотидных последовательностей сегмента генома NA (N5) вируса гриппа, построенная методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрогаммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Отмечен штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5). Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт



Евразийские вирусы птиц

Рисунок 33 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома РА вируса гриппа, построенная методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Отмечен штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом; зоонозный штамм выделен красным; штаммы, выделенные от млекопитающих выделены синим. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

По сегменту РА исследуемый штамм принадлежит к Евразийской генетической линии вируса гриппа птиц. Он образует кладу с образцами из Новосибирской области и Народной Республики Бангладеш, которая входит в более крупную филогенетическую группу, образованную вирусами гриппа, выделенными, в основном, на территории Европейской части континента. Референс - штаммы находятся в другой филогенетической группе и показывают родство друг другу. Примечательно, что штамм A/Seal/Sweden/SVA0546/2014, находится в одной подгруппе со штаммами из Азии.

Филогенетическое дерево сегмента PB1 представлено на рисунке 34. По сегменту PB1 исследуемый штамм образует кладу с образцом из

Новосибирской области. Было показано, что эта малая клада входит в крупную филогенетическую группу, которая образована высокопатогенными штаммами, имеющими субтип H5N8 и собранными на территории Египта и Ирана в 2016-2017 годах. Среди результатов поиска наиболее идентичных последовательностей с помощью алгоритма BLAST обнаруживается еще два штамма из Дагестана. Они входят в другую кладу. Вирус A/Common Teal/Dagestan/34d/2019 (H4N6), EPI ISL 403716 образует кладу с образцом из Венгрии, и они, в свою очередь образуют кладу со штаммом A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5), EPI ISL 331307. Референс-штаммы находятся в другой филогенетической группе.

Филогенетическое дерево сегмента PB2 представлено на рисунке 35. По сегменту PB2 картина отличается от таковой для PB1 - исследуемый штамм лежит в большой кладе евроазиатских вариантов, в которую водят и все остальные дагестанские штаммы данного исследования. Достоверных больших субклад в ней выделить не представляется возможным. Было показано, что наиболее близкими филогенетически являются штаммы из Западной Сибири и дагестанский штамм H8N4 A/teal/Dagestan/57d/2018. Референс-штаммы находятся в другой филогенетической группе и больше показывают свое родство друг другу.

Филогенетическое дерево сегмента NP представлено на рисунке 36. По сегменту NP штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5) принадлежит к евразийской генетической линии вирусов гриппа птиц. Он образует маленькую филогенетическую группу с образцом, выделенным на территории Омской области. Она входит в более крупную филогенетическую группу, образованную штаммами из Монголии, Народной Республики Бангладеш и Бельгии. Так же, в еще более крупной кладе присутствуют образцы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс – штаммы образуют отдельную кладу, однако достоверность ее не подтверждена. Интересно, что штамм A/Seal/Sweden/SVA0546/2014 так же находится в ней, показывая филогенетическое родство к азиатским вирусам.

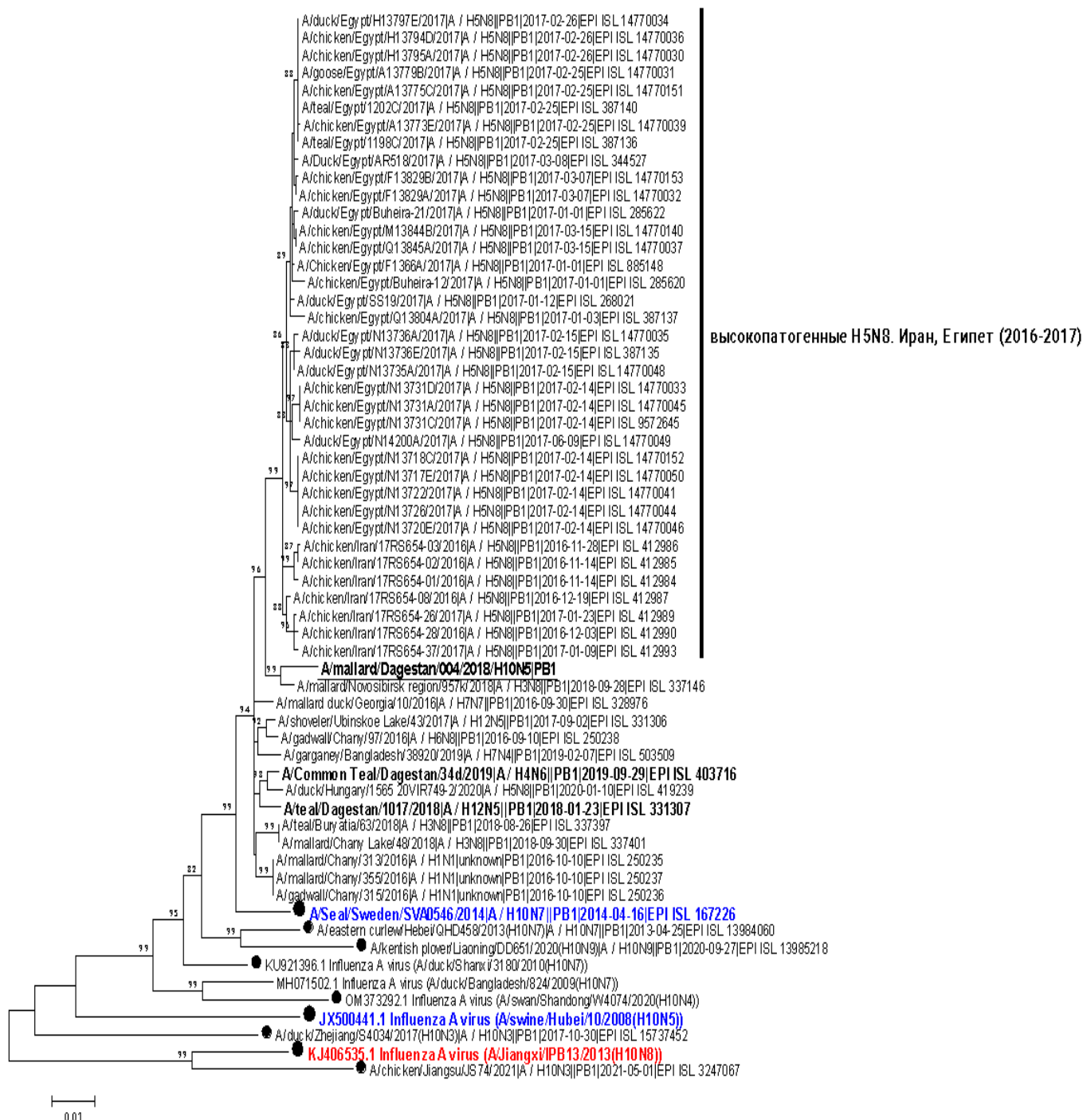


Рисунок 34 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома PB1 вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстрэп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечен штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом; зоонозный штамм выделен красным; штаммы, выделенные от млекопитающих выделены синим. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

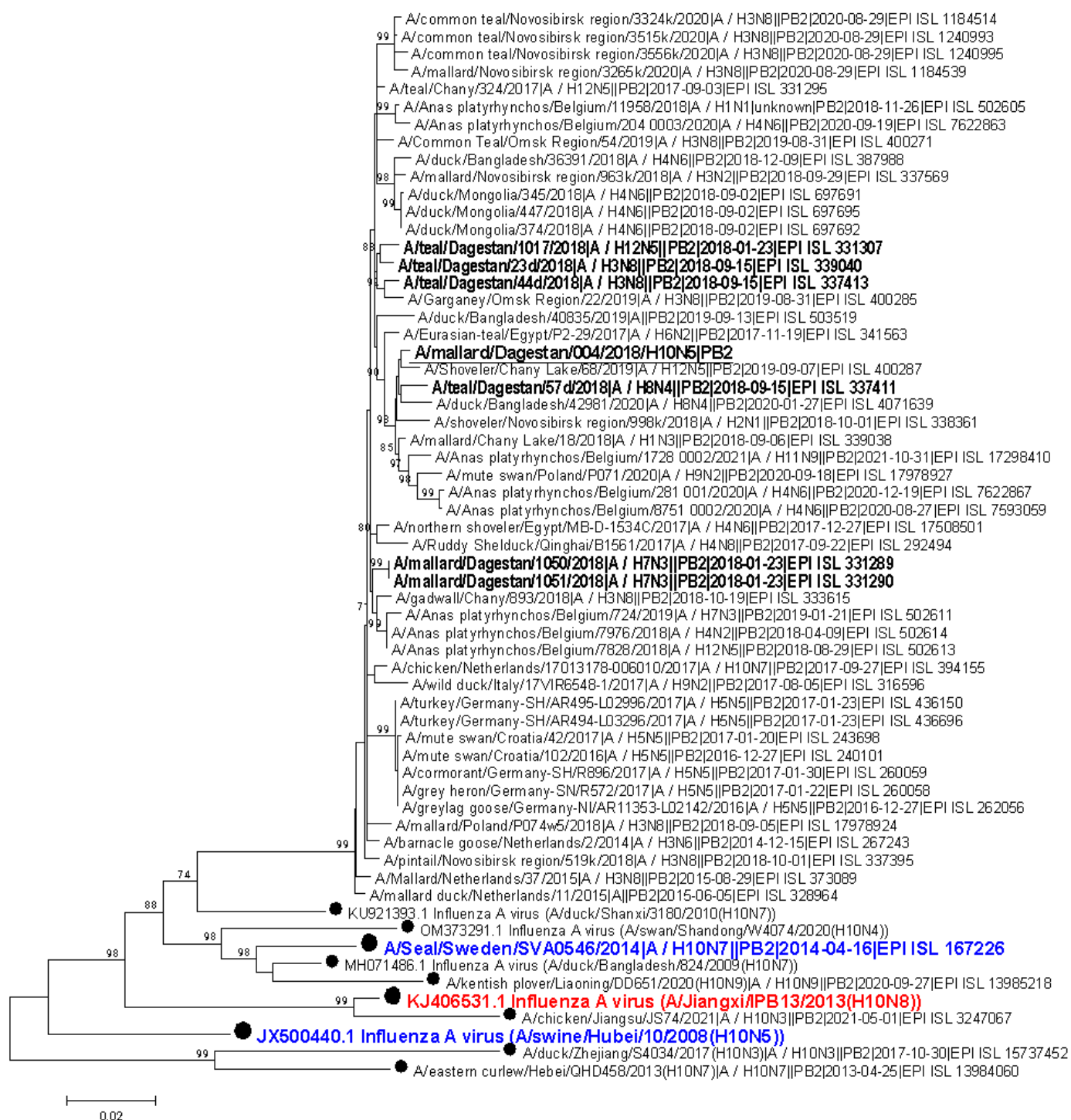


Рисунок 35 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома PB2 вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстрэп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечен штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом; зоонозный штамм выделен красным; штаммы, выделенные от млекопитающих выделены синим. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

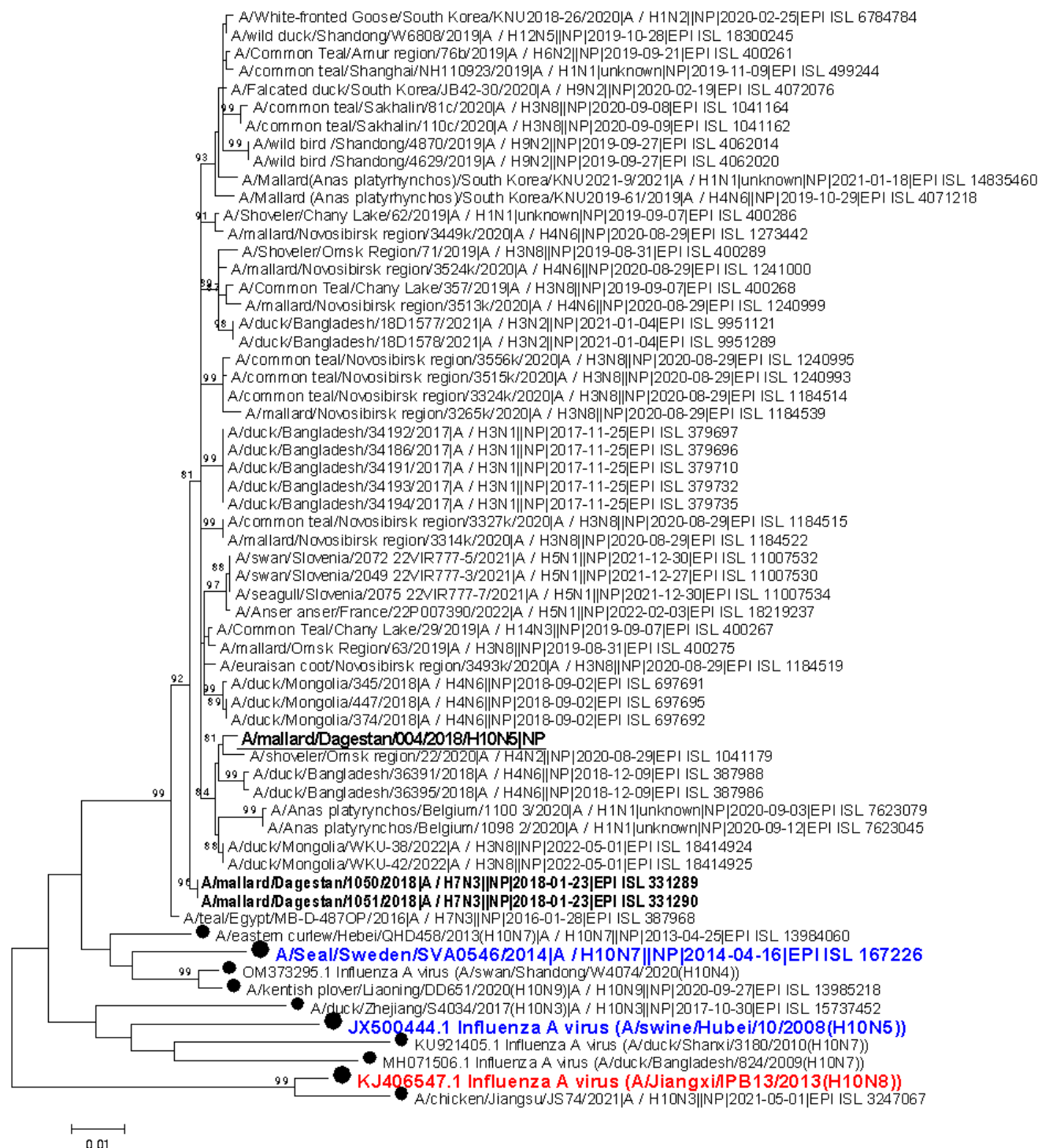


Рисунок 36 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома NP вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстрэп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечен штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом; зоонозный штамм выделен красным; штаммы, выделенные от млекопитающих выделены синим. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

Филогенетическое дерево сегмента NS представлено на рисунке 37. A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс – штаммы образуют отдельную кладу, однако достоверность ее не подтверждена. Интересно, что штамм A/Seal/Sweden/SVA0546/2014 так же находится в ней, показывая филогенетическое родство к азиатским вирусам.

Последовательности сегмента NS генома вирусов гриппа птиц образуют две филогенетические группы – аллель А и аллель В, что согласуется с литературными данными. Исследуемый штамм принадлежит к аллелю А. Так же, к нему принадлежат почти все референс – штаммы, за исключением зоонозного штамма от человека A/Jiangxi/IPB13/2013 (H10N8) и штамма A/chicken/Jiangsu/JS74/2021 (H10N3), EPI_ISL_3247067. Они принадлежат к аллелю В и образуют одну кладу. Так же интересно отметить, что референс - штамм A/swan/Shandong/W4074/2020 (H10N4) не образует кладу с другими референс – штаммами, не имеет близких филогенетических связей с ними.

Филогенетическое дерево сегмента МР представлено на рисунке 38. По сегменту МР исследуемый штамм принадлежит к евразийский генетической линии вирусов гриппа птиц. Он близок образцам, собранным на территории Курганской области, однако не наблюдается достоверная поддержка ветвей. Также выделяется отдельная группа образцов из Австралийского региона, которая имеет достоверную поддержку ветвей.

Интересно отметить, что в данном случае референс -штаммы, а именно A/swan/Shandong/W4074/2020 (H10N4) и A/kentish_plover/Liaoning/DD651/2020 (H10N9), EPI_ISL_13985218 находятся в одной большой филогенетической группе с исследуемым штаммом. Так же, зоонозный штамм от человека A/Jiangxi/IPB13/2013 (H10N8) и штамм A/chicken/Jiangsu/JS74/2021 (H10N3), EPI_ISL_3247067 образую одну отдельную кладу. Это было замечено для всех сегментов генома вируса гриппа, за исключением сегмента НА.

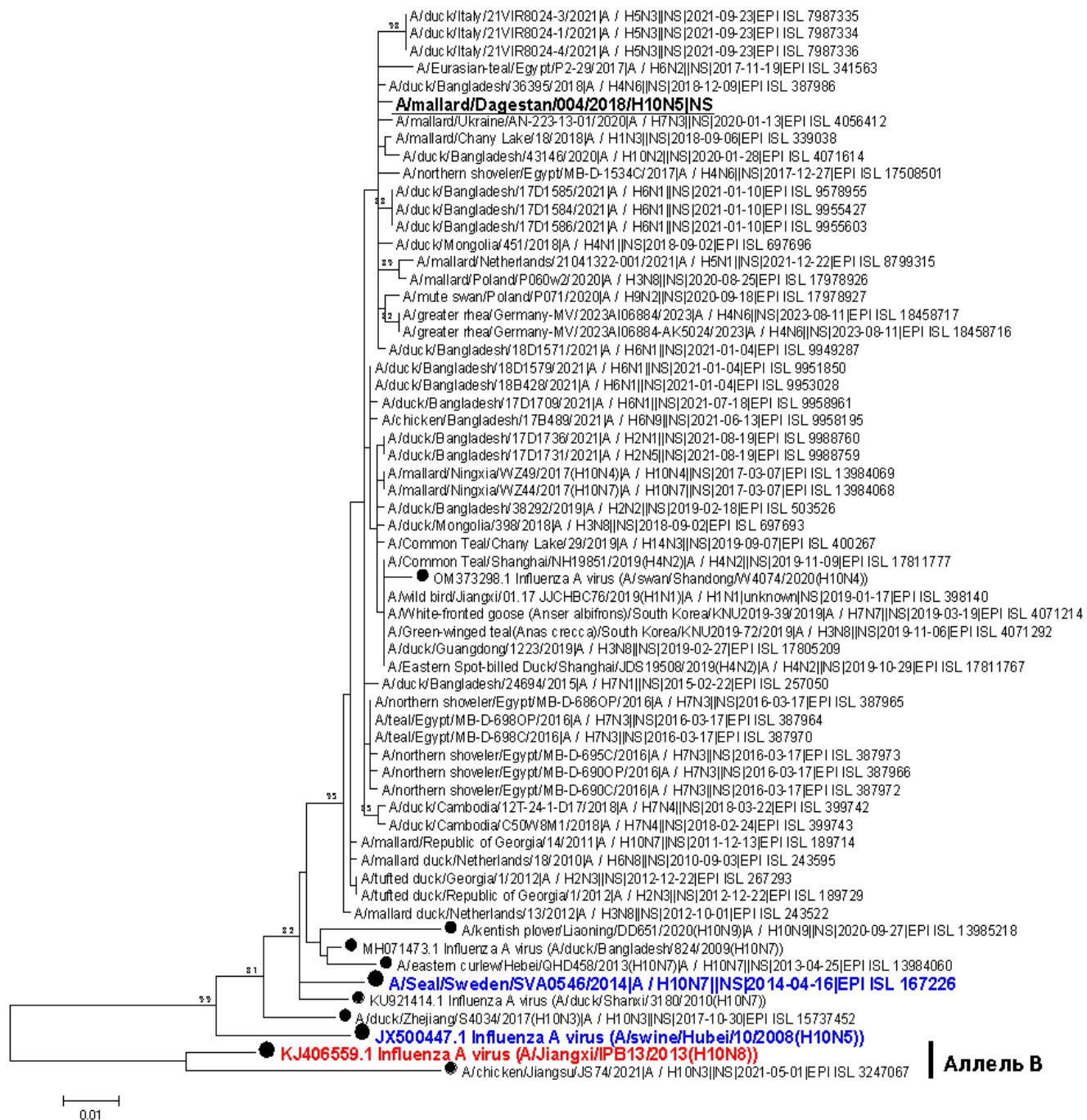


Рисунок 37 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома NS вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечен штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом; зоонозный штамм выделен красным; штаммы, выделенные от млекопитающих выделены синим. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт



Рисунок 38 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома МР вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечен штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом; зоонозный штамм выделен красным; штаммы, выделенные от млекопитающих выделены синим. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

2.2.7.3 Заключение по вирусу по филогенетическому анализу каспийского штамма H10 (обсуждение)

Вирусы гриппа подтипа H10 были выделены у различных видов водоплавающих птиц в географических районах мира на протяжении более 50 лет (H-R. Kim et al., 2013; D. Vijaykrishna et al., 2013; C. Ma et al., 2015). Один из самых распространенных субтипов H10 среди домашних птиц – это субтип H10N3. Вирус H10N3 был выделен в Гонконге в 1979 году (T. Mikami et al., 1982), а на рынке живой птицы в Таиланде в 2011 году (T. Wisedchanwet et al., 2011). Однако патогенность вирусов H10N3 у млекопитающих остается в значительной степени неясной.

Первый изолят H10N7 был выявлен у кур в Германии (A. Darveau et al., 1982). В 2010 году штамм H10N7 вызвал заболевание на птицефабрике в Австралии, после этого новый реассортант H10N7 AIV был обнаружен у кур в Восточном Китае (G.G. Arzey et al., 2012).

Очень важно было оценить патогенность для млекопитающих, и, следовательно, патогенный потенциал для человека. Вирусы H10 иногда заражают людей. В данном исследовании были включены в сравнительный анализ референс-штамм, выделенный от человека, для выяснения, существуют ли филогенетические связи с ним. Недавно вирус H10N7 был выделен из трупов морских котиков в Дании (J.S. Krog et al., 2015). Кроме того, изолят H10N4 вызвал вспышку респираторного заболевания у норок в Швеции (L. Englund, 2000). Вирус H10N5 был обнаружен у свиней в 2008 году (N. Wang et al., 2012), этот штамм был взят в качестве референсного для филогенетического анализа.

Случаи инфицирования людей вирусом гриппа H10N8-субтипа были зарегистрированы в провинции Цзянси, Китай, в 2013–2014 (H.Y. Chen et al., 2014). Секвенирование этих вирусов показало, что все шесть внутренних сегментов принадлежат к подтипу H9N2 генотипа G57 (S. Su et al., 2014). Это был первый случай смерти человека в результате заражения вирусом птичьего гриппа H10, произошедший в провинции Цзянси. Пожилая женщина страдала

рядом хронических заболеваний и имела ослабленный иммунитет; поэтому неясно насколько смертельной была бы инфекция у здорового человека. Женщина, по-видимому, заразилась инфекцией после посещения рынка живой птицы. Она была госпитализирована в местную больницу 30 ноября, где скончалась от тяжелой пневмонии и полиорганной недостаточности через девять дней после первоначального появления симптомов. Вирус A/Jiangxi-Donghu/346/2013 был нами взят в качестве референсного. В целом, передача H10 субтипа от птиц человеку увеличивает риск адаптивных точечных мутаций или реассортации у H7N9 и H9N2 субтипов AIV, а также возникновение сезонных вирусов человека с высоким пандемическим потенциалом (W. Qi et al., 2014; M. Hu et al., 2015). Пока различные варианты вируса гриппа H10-субтипа (например, H10N8, H10N3 и H10N7) циркулируют на рынках Китая, продающих живую птицу, сохраняется потенциал инфицирования млекопитающих (G. Deng et al., 2015).

Филогенетический анализ истории H10N8 позволяет предположить, что вирус перешел от дикой птицы к домашней в Южном Китае (T. Zhang et al., 2014). Вызывает беспокойство тот факт, что за пределами Китая вирусы гриппа птиц H10-субтипа (в основном H10N7), по-видимому, являются эндемичными в популяциях диких птиц: они были обнаружены в Италии, Соединенных Штатах, Южной Африке, Канаде, Южной Корее, Швеции и Японии с 1965 года.

В данном исследовании не было обнаружено сегментов штамма H10N5, которые бы относились к зоонозным вариантам. Филогенетический анализ последовательностей сегмента НА, доступных в базе данных ресурсов по вирусам гриппа NCBI, показал, что вирус гриппа H10-субтипа можно разделить на североамериканскую и евразийскую линии (S. Liu et al., 2009). Все сегменты генома данного штамма выявили принадлежность к евразийской линии.

Таким образом, исследованный штамм является классическим низкопатогенным вирусом диких уток и не обладает патогенным потенциалом для человека согласно изученным маркерам. Однако в будущем не исключена

передача сегментов от других зоонозных вариантов. Низкая патогенность вирусов H10 у птиц затрудняет их обнаружение, позволяя вирусу сохраняться и распространяться; это означает, что дикие птицы и домашняя птицефабрика могут выступать в качестве крупных резервуаров вируса.

2.2.8 Биологические свойства и генетическая характеристика низкопатогенных вирусов гриппа H12N5 субтипа

2.2.8.1 Антигенные свойства вируса A/teal/Dagestan/1017/2018

Чтобы определить антигенные различия между вирусами A/H12, был проведен антигенный анализ с использованием поликлональной куриной антисыворотки, полученной против вируса A/teal/Dagestan/1017/2018 и других референс-вирусов H12-субтипа из коллекции ФИЦ ФТМ этих вирусов. Все изоляты продемонстрировали перекрестную реактивность со всеми куриными постинфекционными антисыворотками (таблица 9). Только один изолят A/1377, который принадлежал к американской линии, показал четырехкратное снижение титров НА для антисыворотки, полученной против A/962 и A/999, по сравнению с гомологичными вирусами, что указывает на антигенное разнообразие между этими вирусами.

Таблица 9 – Результаты изучения антигенных свойств штамма A/teal/Dagestan/1017/2018 в реакции торможения гемагглютинации

Сыворотки кур	Антигены					
	A/43	A/324	A/1017	A/962	A/999	A/1377
A/1377	80	80	80	80	160	160
A/999	80	80	80	80	160	40
A/962	80	80	80	160	160	40
A/1017	160	160	160	320	640	160
A/324	160	160	80	160	640	160
A/43	160	160	80	160	320	80

2.2.8.2 Молекулярно-биологические свойства и филогенетический анализ вируса A/teal/Dagestan/1017/2018

Был проанализированы аминокислотные замены штамма, выявлены основные известные биологические маркеры (таблица 10). Было обнаружено, что у штамма присутствуют замены, отвечающие за ограниченную

вирулентность у мышей и хорьков в сегментах PA (P149S) и PB2(Q391E), соответственно. С другой стороны, имелись замены в сегменте PB2 (L89V, G309D, T339K, R477G, I495V, K627E, A676T), которые потенциально могут повысить активность полимеразы в клетках мыши. Кроме того, наряду с заменой в PB2 (K627E), снижающей скорость репликации в клетках млекопитающих, там же имелась замена N701D, которая может приводить к увеличению летальности у мышей. Однако в данном эксперименте летальности среди мышей обнаружено не было.

Таблица 10 – Аминокислотные замены штамма A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5), потенциально связанные с репликацией, патогенностью и трансмиссией

Сегмент	Аминокислотная позиция	Потенциальный эффект	Субтип, для которого показан эффект	Источник
PA	149S	P149S — ограниченная летальность у мышей	H5N1	(B. W. Leung et al., 2010)
PA	515A	T515A — снижение активности полимеразы	H5N1	(D. J. Hulse-Post et al., 2007)
PB1	598L	P598L — снижение репликации в MDCK	H1N1, H5N1	(C. Xu et al., 2012)
PB2	391E, 627E	Q391E — снижение вирулентности у хорьков; K627E — снижение репликации в клетках млекопитающих	H5N1	(R. Salomon et al., 2006; J. Bogs et al., 2011)
PB2	701D	N701D — увеличение летальности у мышей	H5N1	(Z. Li et al., 2005)
PB2	89V, 309D, 339K, 477G, 495V, 627E, 676T	L89V, G309D, T339K, R477G, I495V, K627E, A676T — повышение активности полимеразы в клетках мыши	H5N1	(J. Li et al., 2009)

Был проведен филогенетический анализ сегментов генома штамма A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5), для того чтобы лучше понять эволюционные взаимосвязи между новым штаммом H12N5 и другими штаммами AIV, были построены и проанализированы филогенетические деревья методом максимального правдоподобия (ML).

Для этого были включены последовательности, полученные BLAST анализом из базы, а также включены последовательности 2 референс-штамма,

выявленных в ходе анализа доступной литературы (V.N. Bui et al., 2015; L. Tang et al., 2020).

Филогенетическое дерево сегмента NA представлено на рисунке 39. Последовательность сегмента NA исследуемого штамма образует отдельную достоверную кладу с вирусами H12N5, выделенными на юге Западной Сибири, в том числе от диких уток, собранных на озере Чаны, что располагается в Новосибирской области. В целом, евразийская крупная клада образована самыми разнообразными вирусами H12 субтипа. Она же имеет общего предка с отдельной линией австралийских вирусов – на дереве представленных вирусом H12N9, выделенным от кулика песочник-красношейка (*Calidris ruficollis*). Очевидно, что существуют отдельные генетические группы для вирусов гриппа H12-субтипа из Евразии и Американских континентов.

Филогенетическое дерево сегмента NA представлено на рисунке 40. Последовательность сегмента NA исследуемого штамма образует кладу с образцом, собранным на озере Чаны, что располагается в Новосибирской области. Эта клада образует более крупную филогенетическую группу, где представлены образцы вирусов гриппа, изолированные на территории стран Европы. Достоверно отлична от нее другая крупная филогенетическая группа, куда входит референс – штамм A/mallard/Shanghai/NH011204/2018 (H12N5), он показывает свое родство другим вирусам из Китая и Японии. Так же, интересно отметить кладу, образованную вирусами гриппа H5N5-субтипа, которые были выделены в странах Европейской части континента, а также, кладу, образованную, в основном, штаммами, которые имеют субтипы H12N5 и H5N5 и были выделены на территории России (Новосибирской области, Омской области, Бурятии).

Филогенетическое дерево сегмента PB2 представлено на рисунке 41. По сегменту PB2 исследуемая последовательность расположилась в одной кладе с другим образцов из Дагестана, который имеет субтип H3N8. Если рассматривать более крупную филогенетическую группу, в которую она входит, то там можно наблюдать еще один вирус, выделенный на территории

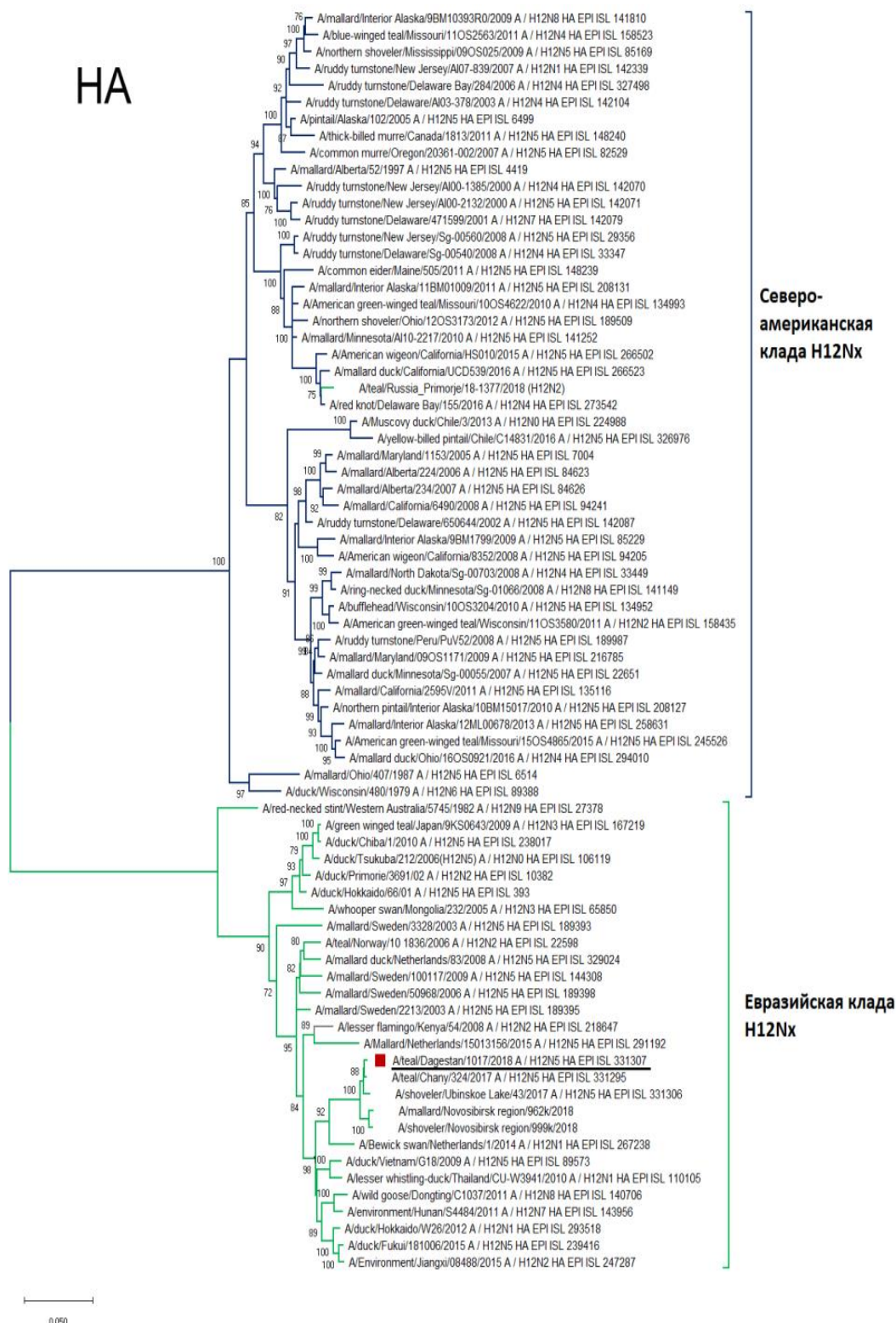


Рисунок 39 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома HA вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечен штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5). Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

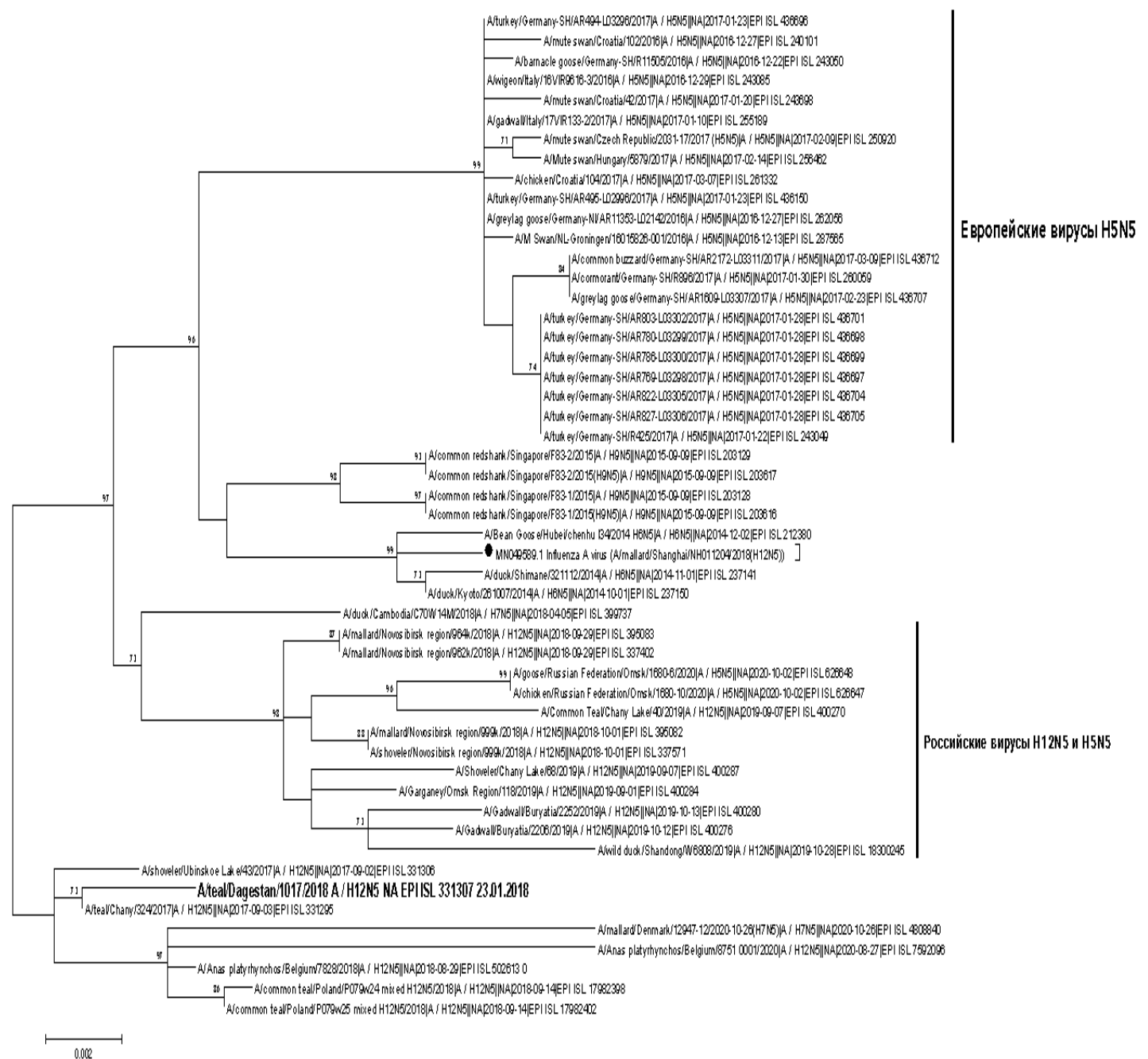


Рисунок 40 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома NA вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Отмечен штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5). Референс-штамм отмечен черным кругом. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт



Европейские вирусы H5N5

Рисунок 41 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома PB2 вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстрэп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечен штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

Дагестана и образец из Омской области. Также, выделяется довольно большая филогенетическая группа, которая состоит из Европейских вирусов, имеющих субтип H5N5. Референс – штаммы не показывают своего достоверного присутствия рядом с какими – либо образцами. Интересно также отметить тот факт, что среди результатов поиска наиболее идентичных последовательностей с помощью алгоритма BLAST помимо вышеупомянутых штаммов из Дагестана, присутствуют штаммы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3) и они также образуют одну кладу с образцом из Новосибирской области и образцами из Бельгии.

Филогенетическое дерево сегмента PB1 представлено на рисунке 42. По сегменту PB1 исследуемую последовательность нельзя достоверно отнести к какой – либо филогенетической группе. Дендрограмма составлена по большей части из образцов, собранных в странах Европы и на территории Сибири, а также в Народной Республике Бангладеш. Все это образует крупную кладу. Референс – штаммы же, которые были получены на территории Азиатских стран, а именно Китая и Японии, не входят в эту крупную филогенетическую группу, однако их положение на дендрограмме не достоверно.

Филогенетическое дерево сегмента PA представлено на рисунке 43.

В данном случае, в противоположность картине для последовательностей сегмента PB1 дендрограмма состоит из штаммов, собранных в разных странах Азии, хотя референс -штаммы также образуют отдельную кладу, хотя это и не подтверждается достоверной поддержкой ветвей. Однако, нельзя сказать, что исследуемая последовательность располагается в какой-либо филогенетической подгруппе. Так же, можно заметить, что образцы, изолированные на территории Сибири (Новосибирской области, Омской области Бурятии) образуют филогенетическую подгруппу.

Филогенетическое дерево сегмента NS представлено на рисунке 44. В целом, результаты подтверждают принадлежность штамма Аллелю В по сегменту NS, это было показано на общем дереве по сегменту NS (глава 3.5.6). Референсы лежат в другом аллеле.

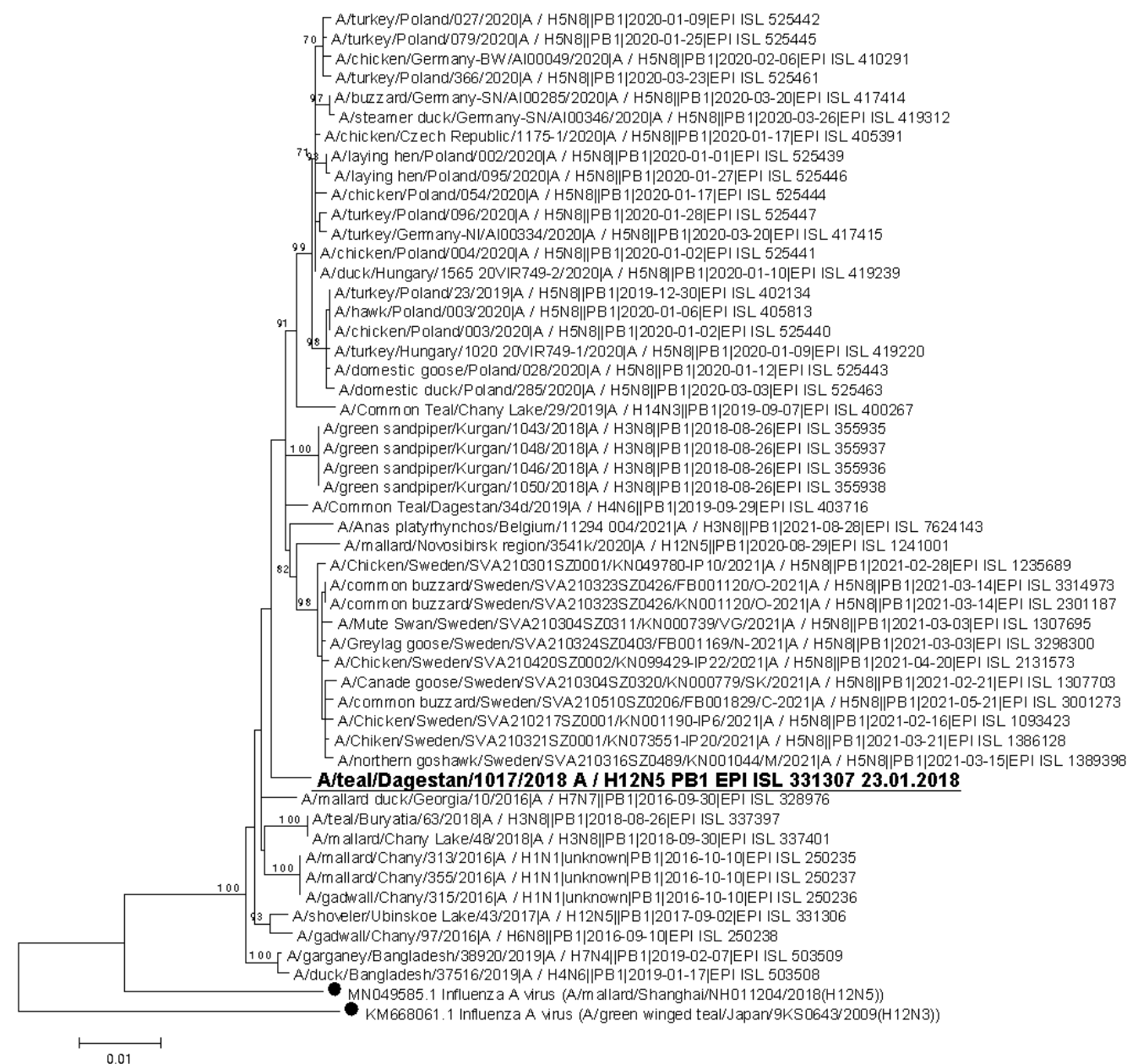
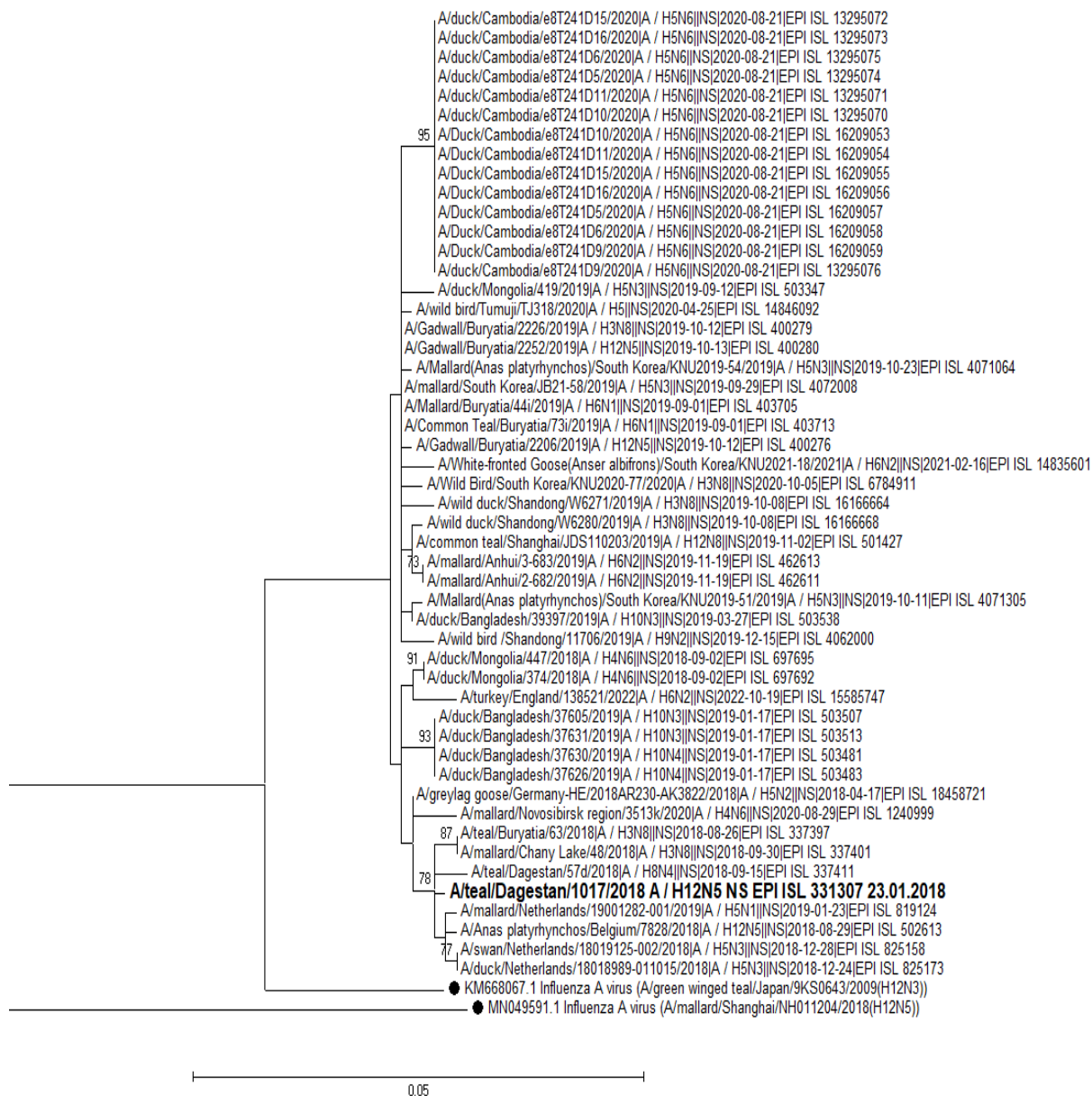


Рисунок 42 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома PB1 вируса гриппа, построенная методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстрэп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечен штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт



Азиатская клада LPAI вирусов

Рисунок 43 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома РА вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Отмечен штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт



Алель В

Рисунок 44 – Филогенетическая дендрогамма нуклеотидных последовательностей сегмента генома NS вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрогаммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстрэп-статистики указаны слева от ветвей. Отмечен штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

Филогенетическое дерево сегмента NP представлено на рисунке 45. По сегменту NP исследуемый штамм принадлежит к евразийской генетической линии вируса гриппа птиц. Он образует кладу с другими образцами из Дагестана, а также образцами, собранными на территории Омской области и Германии. На данной дендрограмме можно заметить обилие Европейских вирусов. Почти вся крупная кладка, куда референс – штаммы из Японии и Китая не входят, состоит из образцов Европейских и Сибирских. Выделяется, например, кладка высокопатогенных вирусов субтипа H5N8, изолированных на территории Европейских стран (Венгрии, Македонии, Болгарии, Хорватии, Италии, Германии) в 2016-2017 годах. Так же, можно выделить подгруппу вирусов, выделенных от домашних уток на территории Народной Республики Бангладеш.

Филогенетическое дерево сегмента MP представлено на рисунке 46. По сегменту MP исследуемый штамм принадлежит к евразийской генетической линии вирусов гриппа птиц. Он близок образцам, собранным на территории Дагестана, Бельгии и Новосибирской области, однако не наблюдается достоверная поддержка ветвей. На данной дендрограмме также наблюдается присутствие других штаммов из Дагестана. Например, штаммы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс – штаммы, как и в случаях для других сегментов отличаются от большой клады, в которую входит исследуемый штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5).

2.2.8.3 Заключение по филогенетическому анализу каспийского штамма H12

В данном исследовании был впервые обнаружен вирус гриппа редкого субтипа H12N5 на территории западного побережья Среднего Каспия и поставили задачу оценить патогенный потенциал для животных и человека.

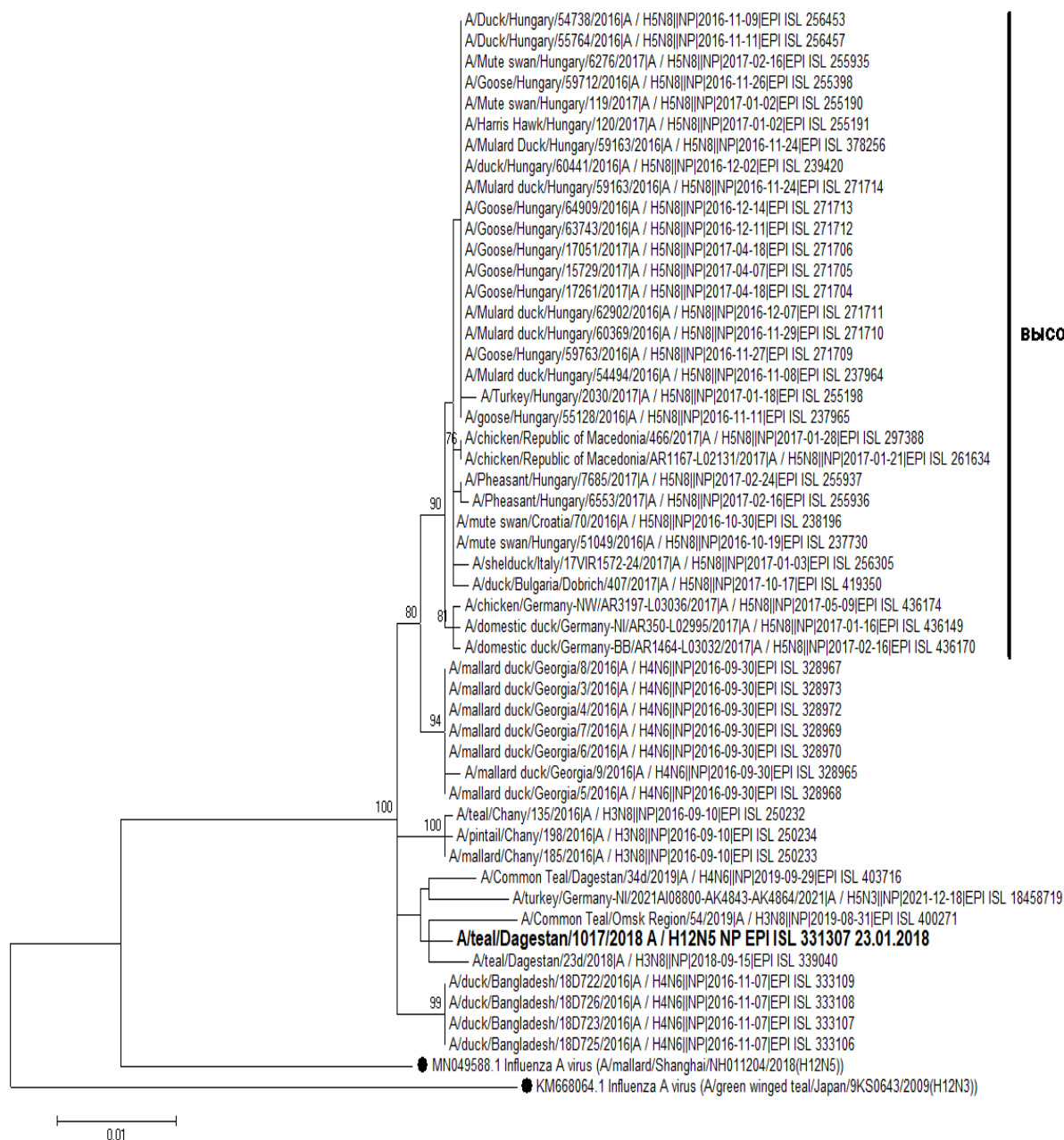


Рисунок 45 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома NP вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстрэп-статистики указаны слева от ветвей. Отмечен штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт



Рисунок 46 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома МР вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстрэп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечен штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

Подтип H12 также ассоциирован с водоплавающими птицами, но он редко обнаруживается в природе (M. Wille et al., 2018; L. Tang et al., 2020). Субтип H12 был впервые обнаружен в Канаде в 1983 году. Наиболее известное обнаружение H12 вируса в соседнем Азово-Черноморском географическом регионе относится к исследованию 2001-2012, когда из 6281 образца от диких водоплавающих птиц был выделен всего один вирус H12-субтипа. Этот регион считается частью трансконтинентальных маршрутов миграции диких птиц из Северной Азии и Европы в Средиземноморье, Африку и Юго-Западную Азию (D. Muzyka et al., 2016), при этом вирус H12 был молекулярно-эпидемиологически связан с вирусами из Европы и Юго-Восточной Азии.

Мы обнаружили, что наш штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5) принадлежит к евразийским генетическим линиям, в том числе по сегменту НА, являющегося основным антигеном. Известно, что существует отдельная североамериканская и южноамериканская линии. Например, в ходе активного эпиднадзора в Чили с 2012 по 2014 год было обнаружено несколько штаммов H12 субтипа дикого птичьего происхождения у домашней мускусной утки (*Cairina moschata*), что указывает на передачу вируса гриппа А субтипа H12 от диких птиц домашним (P. Jimenez-Bluhm et al., 2018).

Азиатские варианты H12 по результатам данного исследования и данным литературы имеют специфические клады, циркулирующие в Юго-Восточной Азии, с проникновением на северные территории гнездования. Например, вирус гриппа H12N2-субтипа был идентифицирован в образце фекалий чирка-клоктуна *Anas falcata*, обитающего в водно-болотных угодьях озера Донгтинг, что было первым сообщением об H12N2, обнаруженном у диких птиц в Китае (J. Liu et al., 2020). Филогенетический анализ показал, что все восемь сегментов субтипа H12N2 сгруппированы в евразийскую линию. Было также показано, что этот штамм тесно связан с штаммами, происходящими от уток, гусей и диких птиц. Это позволяет предположить передачу вируса гриппа А по миграционному пути Восточная Азия – Австралия. Кроме того, данные результаты подразумевали взаимодействие между дикими и домашними

птицами и установили необходимость долгосрочного и систематического наблюдения за популяциями диких птиц (J. Liu et al., 2020). Аналогичная картину обнаружила и для Прикаспийского региона, граничащего с Европой.

Интересно, что для восточноазиатских вариантов вируса H12Nx характерна частая реассортация с североамериканскими штаммами. Так, часть геномных сегментов двух изолятов H12N2 (NH112319-H12N2 и NH101807-H12N2) из Китая (Шанхай) принадлежат к североамериканской линии, что позволяет предположить межконтинентальную реассортацию среди H12 в Евразии и Северной Америке (L. Tang et al., 2020). Такой же факт обнаружен при исследовании российского Дальнего Востока (K. Sharshov et al., 2019).

Впервые же обнаруженный в Японии H12N3, выделенный от чирка-трескунка (*Anas crecca*) в Японии в 2009 году оказался множественным реассортантным, но имеющим гены НА и нейраминидазы евразийской «птичьей» линии (V.N. Bui et al., 2015).

Масштабный анализ Wan с соавт., 2022 показал, что дикие птицы относящиеся к роду речные утки (*Anas*) и роду камнешарки (*Arenaria*), а также два пути миграции из Азии в Океанию и из Европы в Южную Америку играют важную роль в распространении H12 у диких птиц (Z. Wan et al., 2022). Восточноазиатско–Австралазийский пролет, вероятно, ответственен за распространение H12 из Азии в Океанию. Что касается миграционного маршрута из Европы в Южную Америку, то H12, вероятно, распространился неизвестным путем. Однако вирусы гриппа H12-субтипа из Южной Америки были сгруппированы с вирусами из Америки, что указывает на то, что распространение H12 в Южной Америке, вероятно, также произошло из Северной Америки. Поскольку вирус гриппа H12-субтип относительно редко детектируется у диких птиц, данные по H12 могут отсутствовать, а погрешность выборки может повлиять на достоверность результатов.

Известны исследования биологических характеристик штамма H12-A.formosa/354. Хотя изолят H12 не мог эффективно реплицироваться у мышей BALB/c, A.formosa/354 обладал способностью к эффективной репликации в

РКЭ, клетках MDCK и A549 (Z. Wan et al., 2022). Данные согласуются с полученными нами результатами экспериментов со штаммом A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5).

Подводя итог, проведенное исследование предполагает, что появление генетически разнообразных вирусов гриппа H12-субтипа в географически отдаленных друг от друга регионах связано с миграцией диких птиц. Очевидно, что продолжение надзора за разнообразием H12 у диких птиц необходимо для улучшения понимания естественной истории редких субтипов.

2.2.9 Практическая значимость результатов исследования: формирование коллекции штаммов и депонирование в государственных коллекциях

Все исследованные штаммы вирусов гриппа А были паспортизованы (Приложение Б), из них была сформирована лабораторная коллекция штаммов.

Наиболее актуальные штаммы, которые целесообразно использовать в дальнейших прикладных исследованиях по созданию штаммов-продуцентов для диагностики, были переданы на патентное депонирование в следующие государственные коллекции РФ:

Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Коллекция вирусов гриппа и ОРЗ, отдел этиологии и эпидемиологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России. Информация о переданных штаммах представлена в таблице 11.

Таблица 11 – Патентное депонирование штаммов в государственные коллекции РФ

№ п/п	Штамм	Субтип	Авторы	Государственная Коллекция	Номер в государственной коллекции
1.	A/mallard/Dagestan/1051/2018	H7N3	Мурашкина Т.А. , Шаршов К.А., Дерко А.А., Глущенко А.В., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.	«НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева»	859
2.	A/teal/Dagestan/57d/2018	H8N4	Мурашкина Т.А. , Шаршов К.А., Дерко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.	«НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева»	860
3.	A/mallard/Dagestan/004/2018	H10N5	Мурашкина Т.А. , Шаршов К.А., Дерко А.А., Глущенко А.В., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.	«НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева»	861
4.	A/teal/Dagestan/1017/2018	H12N5	Шаршов К.А., Дерко А.А., Мурашкина Т.А. , Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Гаджиев А.А., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»	V-880
5.	A/teal/Dagestan/59/2017	H3N8	Шаршов К.А., Дерко А.А., Мурашкина Т.А. , Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Гаджиев А.А., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»	V-886
6.	A/teal/Dagestan/120/2017	H3N8	Шаршов К.А., Дерко А.А., Мурашкина Т.А. , Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Гаджиев А.А., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»	V-887
7.	A/mallard/Dagestan/1050/2018	H7N3	Шаршов К.А., Дерко А.А., Мурашкина Т.А. , Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Гаджиев А.А., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»	V-899

ОБСУЖДЕНИЕ

Мониторинг вируса гриппа А в популяциях диких птиц на ключевых территориях западного побережья Среднего Каспия проводится впервые. Необходимость мероприятия по мониторингу вируса гриппа на данных территориях обусловлена климатогеографическими и экологическими особенностям. Республика Дагестан является одним из регионов, который расположен на путях миграций птиц между странами средиземноморского бассейна, Африки и России. Обширные системы рек и озер на данных территориях являются гнездовыми ареалами птиц водных экологических комплексов, местами их остановок и зимовки.

Пересечения миграционных путей повышают вероятность участия диких птиц в циркуляции вирусов гриппа на обширных территориях. Также повышается вероятность образования вариантов вируса с новыми антигенными свойствами в пределах различных популяций и занесения штаммов высоко патогенного гриппа птиц на новые территории.

Таким образом, территория западного побережья Среднего Каспия играет важную роль в исследованиях экологии вируса гриппа А в популяциях диких птиц водных экосистем.

В ходе исследования из 1438 образцов было выделено 43 гемагглютинирующих агента, что составило 2,99 % от общего количества исследованных образцов, 21 из которых определены как вирус гриппа А, что составило 1,46% от общего количества исследованных образцов. Гемагглютинирующих изолятов относящихся к птичьим парамиксовирусам (APMV) было выделено 15, что составило 1,04% от общего количества исследованных образцов. Также было выделено 7 гемагглютинирующих агента, которые с помощью используемых методов идентифицировать не удалось.

Наибольшая доля выделения AIV приходится на отряд *Anseriformes*. От птиц данной группы было выделено 36 изолятов, что составило 83,7% от всех выделенных в данной работе изолятов, что согласуется с результатами

аналогичных работ, выполненных ранее и проанализированных в обзоре литературы.

Для обеспечения контроля за циркуляцией ВГА в популяциях диких птиц и изучения экологии вируса необходимо дальнейшее изучение, с использованием молекулярно-генетических методов, изучение филогенетических связей.

Исходя из филогенетического анализа можно заключить, что акватория Каспийского моря представляет собой резервуар, в котором может происходить обмен генетическим материалом вирусов гриппа из различных, в т.ч. значительно дистанцированных географических регионов. Примечательно, что штаммы, изолированные в Дагестане, генетически разнообразны и значительно отличаются друг от друга. Отдельные сегменты их геномов принадлежат к разным филогенетическим группам. В частности, по сегменту NS штаммы однозначно разделяются на две генетически дистанцированных филогенетических группы.

Различным штаммам из Дагестана по тем или иным сегментам генома филогенетически родственны варианты вируса гриппа, обнаруженные в Сибири (Чановская озерная система, Убинское озеро). Кроме того, выявлены сегменты генома, схожие с генами штаммов, выделенных в Европе (Германия, Чехия, Нидерланды, Хорватия).

Часть проанализированных сегментов генома родственна сегментам, характерным для Восточной и Центральной Азии. Таким образом, среди исследованных штаммов обнаружен генетический материал, характерный для различных регионов Евразии.

Кроме того, схожие сегменты генома вируса гриппа А были обнаружены в Народной Республике Бангладеш и Египте, т. е. в Южной Азии, а также на Синайском полуострове и в Северо-Восточном регионе Африки. Кроме того, генетически близкие сегменты геномов были выявлены у вирусов гриппа А, выделенных на территории Грузии, что позволяет предполагать возможность

распространения вирусов гриппа птиц между акваториями Каспийского и Черного морей.

Различия в филогенетическом окружении разных сегментов одних и тех же штаммов вируса гриппа А, выделенных в Дагестане, указывают на реассортацию, приводящую к появлению вариантов вируса с новыми комбинациями сегментов генома.

Примечательно, что часть штаммов из Дагестана по некоторым сегментам генома родственны высокопатогенному варианту вируса гриппа А субтипу H5N8. В частности, штаммы A/pochard/Dagestan/92/2017 (H3N8) и A/teal/Dagestan/141/2017 (H3N8) по сегментам NP и PB1 схожи со штаммами субтипа H5N8, выделенными из разных географических регионов (NP – из Азии, а PB1 – из Европы), а штамм A/gadwall/Dagestan/156/2017 (H4N6) по сегменту PB2 родственен штаммам субтипа H5N8 из Бангладеш и Египта. Таким образом, проведенное исследование указывает на циркуляцию вариантов вируса гриппа А, возникших в результате обмена генетическим материалом между штаммами различных субтипов, в том числе высокопатогенных.

Мы в своих исследованиях не нашли высокопатогенного вируса гриппа А. Однако известно, что в 2005, 2006, 2008, 2022 гг. в Каспийском регионе высокопатогенный грипп был детектирован (Д.К. Львов и др., 2006; N. Zinyakov et al., 2022; I. Sobolev et al., 2023). Так, в 2005-2008 гг., во время первой волны эпизоотии гриппа, вызванного самым первым вариантом H5N1, была зарегистрирована крупная вспышка среди лебедей и других водоплавающих в Астраханской области (Д.К. Львов и др., 2006). В 2020-2021 гг. на Каспии был обнаружен H5N5 (N. Zinyakov et al., 2022). В 2022 году была зарегистрирована гибель большого числа диких птиц на острове жемчужный (I. Sobolev et al., 2023). Эти факты подчеркивают важную роль региона в циркуляции не только низкопатогенных вирусов гриппа птиц.

Некоторые штаммы LPAIV, принадлежащие к подтипам H5 и H7, способны мутировать в высокопатогенные варианты (HP), которые могут вызывать высокие показатели заболеваемости и смертности в птичьих

популяциях. Высокопатогенный птичий грипп (HPAI), ранее называемый «птичьей чумой», привел к огромным социально-экономическим потерям в птицеводстве и может привести к смертельным инфекциям среди людей. Рецидивирующие зоонозные инфекции AIV H5 и H7 имели место у людей в течение последних двух десятилетий. В частности, передача вируса от птицы к человеку связана с линией HPAIV H5N1 A/goose/Guangdong/1996 (Gs/GD), которая появилась у домашней птицы в 1997 году, а затем эволюционировала в разнообразные линии HPAI H5; более недавним появлением вируса LPAI H7N9, который в настоящее время совместно циркулирует с вариантами HPAI H7N9 в птичьих стадах (S.J. Lycett et al., 2019). В то время как вирус H5 имеет наибольшую летальность для человека из всех зоонозных вариантов, общее число случаев заражения людей вирусом гриппа H7N9-субтипа намного превысило те, которые официально зарегистрированы для случаев H5 (M.M. Naguib et al., 2019). Учитывая, что эндемическая циркуляция подтипов AIV у домашней птицы увеличивает вероятность зоонозной передачи человеку, в период с 2013 по 2016 гг. большое внимание было сосредоточено на AIV H7, особенно представленном подтипом H7N9 в Китае, который закрепился у домашней птицы и неоднократно передавался людям с 2013 года (FAO, 2019). Вирусы гриппа A(H7N3) и A(H7N7) также были возбудителями исторических инфекций домашней птицы и людей в европейских странах и Северной и Южной Америке (M.S. Dhingra et al., 2018). Однако в 2024 г. большее опасение вызывает вирус гриппа H5-субтипа. Причиной является то, что на фоне широкого распространения H5 с мигрирующими птицами, глобальная передача вирусов H7N9 через перелетных птиц пока не обнаружена (S.J. Lycett et al., 2019). За зарегистрировано распространении человеком - в мясе птицы, незаконно ввезенном из Китая в Японию, был обнаружен новый вариант H7N3, происходящий от зоонозного вируса H7N9. Было показано, что новый вирус H7N3 эффективно размножается у кур и уток без летального эффекта, в то время как предыдущие зоонозные подтипы H7N9 не были хорошо адаптированы к уткам. Основываясь на этих выводах, новый вирус H7N3 AIV

рассматривается как способный к закреплению популяциях диких птиц и распространению в отдаленные районы по миграционным путям (M. Nakayama et al., 2019).

В предыдущих исследованиях LPAI AIV подтипа H7N3 были выделены у многочисленных видов птиц (E.M. Abdelwhab et al., 2014). Почти все эти штаммы принадлежат к классическим линиям вируса диких птиц (Avian-like). В данном исследовании были идентифицированы два новых изолята H7N3 LPAI от диких уток. Это первое сообщение об обнаружении H7N3 LPAIV в регионе Каспийского моря. Были охарактеризованы два новых изолята и выявили свидетельства постоянного обмена сегментами генов с другими евразийскими и африканскими вирусами LPAI, циркулирующими в основном вдоль Черноморско-средиземноморского пролетного пути. Совокупность сегментов генов H7, N3 и внутренних генов, хотя и филогенетически схожая между двумя вирусами, на самом деле представляет собой гетерогенную группу сегментов генов AIV, обнаруженных на пролетных путях диких птиц в Евразии. Например, сегмент гена H7 (LPAI) был похож на сегменты современных изолятов из Грузии, Украины и Монголии. Он также вероятно является предковым для H7 AIV, обнаруженному в Восточной и Южной Азии в 2019 году. Филогенетический анализ показал, что предок этого сегмента гена H7, возможно, циркулировал в Евразии в течение двух десятилетий или более, что предполагает широкое распространение этого подтипа как во времени, так и в пространстве и, возможно, наличие множества видов птиц-хозяев. Более того, были обнаружены близкие родственники сегментов внутренних генов (полимеразы и NP), циркулирующих в H5 HPAI в Евразии (клада 2.3.4.4b), и все сегменты внутренних генов имеют филогенетических родственников в LPAI, циркулирующих у *Anatidae* по всей Евразии. Это подчеркивает пластичность резервуара AIV и необходимость для значительно усиленного надзора за AIV и хозяевами вдоль миграционных путей, связанных с регионами Каспийского и Черного морей.

Большой интерес представляет обнаруженное нами разнообразие субтипов, часть из которых является наиболее представленными и распространенными в популяциях водоплавающих в мире (H1N1, H3N8, H4N6), а другая представлена редкими субтипами (H7N3, H10N5, H12N5). Схожая картина субтипов существует и на зимовках, связанных с Каспийским морем: обнаружены те же основные субтипы и некоторая часть редких, которые дополняются еще субтипами H8N4 H2N1 (D. Muzyka et al., 2016; К.А. Шаршов и др., 2016; D. Venkatesh et al. 2018). Однако, следует сказать, что часть птиц использует Каспийское море и окружающие водоемы в качестве зимовок (Е.В. Вилков, 2017; Е.В. Вилков, 2019). Особый интерес представляет картирование распространения субтипов, наиболее вероятно связанных с исследуемым регионом. Однако, на данный момент, в рамках данного исследования построение карты не представляется возможным, что связано с ограничением географической точности координат доступных в литературе результатов и их ограниченным числом.

Как ранее сообщали Niono T. с соавт. (2015), сегменты H7 HA филогенетически разделены на пять основных линий: древнюю европейскую, австралийскую, лошадиную, североамериканскую и евразийскую. Евразийская линия далее разделяется на три сублинии: древнеевразийскую, европейско-азиатскую и дальневосточную. В этом исследовании вирусы H7N3 принадлежат к европейско-азиатской сублинии, демонстрируя тесную связь с сегментом подтипов H7, такими как H7N7 из Грузии (2016), Южной Кореи (2018), Монголии (2019) и Японии (2019), и имеют общего предка с вирусами H7N3, которые были изолированы в Монголии в 2017 году. Следует отметить, что гены H7 HA дагестанских вирусов H7N3 генетически отличаются от таковых нового зоонозного вируса H7N3, недавно обнаруженного в мясе птицы, незаконно ввезенном из Китая в Японию в марте 2018 года (T. Niono et al., 2015).

Недавние вспышки низкопатогенного вируса птичьего гриппа A(H7N3) североамериканской линии диких птиц у домашней птицы подтвердили, что

вирус может мутировать в высокопатогенную форму за очень короткое время. Таким образом, была проведена оценка угрозы вирусов H7N3 для человека, домашней птицы и диких птиц в Каспийском регионе. В настоящем исследовании не было обнаружено генетических маркеров, указывающих на высокопатогенный фенотип вируса (аминокислотные замены в HA, NA, PB2, PB1-F2, NS1). Эксперименты *in vivo* подтвердили низкую патогенность вирусов на животных моделях цыплят и мышей. Однако низкопатогенные фенотипы H7 AIV могут спонтанно мутировать в HPAI с помощью нескольких различных механизмов, таких как присоединение основных аминокислот к участку расщепления HA с образованием многоосновного участка расщепления в белке H7 HA, вызывая широко распространенное заболевание у домашней птицы (S. Youk et al., 2020). Кроме того, даже вирус птичьего гриппа A (H7N3) низкой патогенности в сочетании с другими патогенами может вызвать смертность среди уток (A. Suttie et al., 2017). Таким образом, продолжение наблюдения вируса H7 AIV в природе, секвенирование и изучение его свойств на животных моделях целесообразно в регионах, где вирус H7 AIV был обнаружен у диких птиц.

Аминокислотный анализ показал, что сайты связывания рецепторов в белках H7 HA указывают на родство к $\alpha 2,3$ -рецепторам сиаловой кислоты, которые преобладают у видов птиц. Хотя данное исследование не выявило каких-либо замен, связанных либо с адаптацией H7 к домашней птице, либо с адаптацией к хозяевам-млекопитающим, спорадическое появление H7 HPAI является причиной для регулярного мониторинга. Тысячи перелетных птиц разделяют экологически разнообразную среду обитания в регионе Каспийского моря, где миграционные пути из Африки и Азии пересекаются с миграционными путями в Сибирь (M. Gulyaeva et al., 2018). Как указывалось выше, патогенный и зоонозный потенциал штаммов H7 может стать причиной для проблем в экономике и общественном здравоохранении. Таким образом, Каспийский регион может быть недооценен с точки зрения его роли в распространении AIV и может представлять большой интерес в качестве

возможного места остановки во время миграции, где различные штаммы AIV могут подвергаться реассортации. Подобные «горячие точки» для вируса гриппа описаны для регионов Черного и Азовского морей Украины и водно-болотных угодий Грузии. Действительно, родственные сегменты генов были обнаружены в H7 AIV у крякв в Украине в 2014 году и Грузии в 2016 году (D. Muzyka et al., 2016, D. Venkatesh et al., 2018;).

В заключение, низкопатогенные AIV вируса H7N3 были выявлены у диких уток-крякв в Каспийском регионе России. Результаты этого исследования предполагают, что вирусы H7N3 могут часто подвергаться реассортации и могут быть естественным рекомбинантом, который включает вирусные генные сегменты, общие как для LPAIV, так и для HPAIV. Таким образом, данные результаты подчеркивают необходимость непрерывного и интенсивного эпиднадзора за гриппом птиц в этом регионе с очень активным пересечением миграционных путей диких птиц. Это может играть ключевое значение при обмене генами AIV в резервуаре с несколькими хозяевами на обширной территории Евразии.

Полученные в данной работе штаммы вируса гриппа А можно использовать в диагностических целях в качестве антигенов и создания на их основе диагностических сывороток. Продолжение регулярного мониторинга вируса гриппа А, полученные данные о биологических свойствах выделенных штаммов, накопление информации о видах-хозяевах ВГА позволят осуществлять адекватное планирование эпизоотологических мероприятий, предполагать наиболее вероятные пути распространения вируса и осуществлять прогнозирование занесения вируса на территорию западного побережья Среднего Каспия.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированный за счет выбора и обоснования ключевых точек мониторинг вируса гриппа А, проведенный в 2017-2020 гг. на территории западного побережья Среднего Каспия, включал отбор и анализ проб биоматериала от 1438 особей 26 видов птиц 7 отрядов. В результате был выделен и охарактеризован 21 штамм вируса гриппа птиц, что составило 1,46% от общего количества исследованных образцов. Дополнительно было выделено 23 гемагглютинирующих агента, не относящихся к вирусу гриппа А, из которых 15 принадлежали авулавirusу птиц (APMV).

2. Вирус гриппа А был выделен от мигрирующих птиц следующих видов: чирок-свистунок (*Anas crecca* n=8), кряква обыкновенная (*Anas platyrhynchos* n=6), чирок-трескунок (*Anas querquedula* n=3), лысуха (*Fulica atra* n=2), красноголовый нырок (*Aythya ferina* n=1), утка серая (*Anas strepera* n=1). Все выделенные штаммы были получены от птиц отряда гусеобразные (*Anseriformes*) семейства Утиные (*Anatidae*), которые относятся к водно-болотной экологической группе, что подтверждает их значительную роль в циркуляции вируса гриппа А.

3. Для выделенных штаммов вируса гриппа были определены субтипы и получены нуклеотидные последовательности: H1N1 (n=2), H3N8 (n=9), H4N6 (n=2), H7N3 (n=2), H8N4 (n=1), H10N5 (n=1), H12N5 (n=1). Из всех выявленных штаммов 43% принадлежали к субтипу H3N8. Не было выявлено высокопатогенного вируса гриппа H5 – субтипа. Для трех изолятов с помощью использованных методов субтип подтвердить не удалось (HxNy (n=3)).

4. В рамках филогенетических подгрупп была показана консервативность сегментов генома NP и MP. Филогенетический анализ MP сегмента выявил принадлежность к 2 евроазиатским кладам вируса гриппа А. По сегменту NP штаммы A/teal/Dagestan/120/2017 и A/teal/Dagestan/57d/2018, а также A/gadwall/Dagestan/156/2017 и A/teal/Dagestan/1017/2018 имели наибольшую идентичность между собой достигающую 99,5%, несмотря на то, что были изолированы в разные сезоны сбора образцов.

5. Показана консервативность сегмента неструктурного белка, который для исследованных штаммов относился к двум аллелям А и В. Нуклеотидные последовательности генетической подгруппы 2.2 аллеля А для сегмента NS оказались характерны для штаммов, циркулирующих в Восточно-Азиатском регионе, в то время как последовательности NS подгруппы 2.1 того же аллеля А характерны не только для азиатских вариантов вируса, но и для европейских.

6. Впервые для Каспийского региона выявлен вирус гриппа редкого H12N5-субтипа в популяциях двух территориальных группировок птиц: западносибирской - казахстанско-каспийской и центральноевропейской – южноевропейской. Филогенетический анализ подтвердил принадлежность к евроазиатским кладам сегментов внутренних белков вируса и указывает на высокую вероятность обмена сегментами с западносибирскими вирусами гриппа А. Штамм обладал высокой репликативной активностью в культурах клеток MDCK, Vero и A549 ($5.0 - 5.4 \pm 0.2 \log_{10} \text{TCID}_{50/\text{mL}}$), а также в системе развивающихся куриных эмбрионов ($7.9 \pm 0.4 \log_{10} \text{EID}_{50/\text{mL}}$). При этом штамм не проявлял вирулентных свойств в экспериментальной модели кур и мышей.

7. Выявлены два штамма вируса H7N3 (LPAIV), у которых сегмент гемагглютинирина H7 (HA) был филогенетически связан с современными штаммами из Монголии и стран Средней Азии и предшествовал распространению этой сублинии H7 в Восточной Азии в 2019 году. Сегмент нейраминидазы N3 и внутренние гены были филогенетически связаны с таковыми, выделенными ранее в Каспийском регионе. Сегменты полимеразы и нуклеопротеина сгруппированы с вирусами H5 NPAI (клада 2.3.4.4b), что указывает на широкое распространение H7 LPAIV и потенциал этого подтипа для реассортации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Уникальные биологические свойства некоторых штаммов, переданных на патентное депонирование в государственные коллекции (см. табл. 11) необходимо использовать для изучения биологии вируса гриппа различных субтипов, лечебной и профилактической эффективности противовирусных препаратов, для создания антигенсодержащих диагностических препаратов, вакцин и в качестве контрольной референс-панели для ПРЦ.

Полученные 43 нуклеотидные последовательности полных геномов изученных штаммов вируса гриппа, зарегистрированные в международной базе данных GISAID, предлагается применять при конструировании праймеров и филогенетических исследований вируса гриппа А.

Разработанную карту-схему ключевых точек исследования вируса гриппа у диких птиц предлагается применять в качестве составной части методических рекомендаций для мониторинга высокопатогенного гриппа птиц в Каспийском регионе.

Полученные результаты целесообразно использовать в учебном процессе в специализированных ВУЗах, а также в дальнейших научных исследованиях и в практической противоэпизоотической работе.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

а.ж. – аллантоисная жидкость
 ВГА – вирус гриппа А
 вРНК – вирусная РНК
 ГАЕ – гемагглютинирующая единица
 гРНК – геномная РНК
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 кРНК – РНК, комплементарная геномной РНК
 КЭ – куриный эмбрион
 мРНК – матричная РНК
 ОТ – обратная транскрипция
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 РГА – реакция гемагглютинации
 РКЭ – развивающийся куриный эмбрион
 РНК – рибонуклеиновая кислота
 РНП – рибонуклеопротеин
 РТГА – реакция торможения гемагглютинации
 ЦПД – цитопатическое действие
 АIV – вирус гриппа птиц (avian influenza virus)
 НА – гемагглютинин
 НРАI – высокопатогенный грипп птиц (highly pathogenic avian influenza)
 IVPI – внутривенный тест на индекс патогенности (Intravenous Pathogenicity Index)
 LPAI – низкопатогенный грипп птиц (low pathogenic avian influenza)
 М1 – матричный белок
 М2 – мембранный белок
 ML – метод максимального правдоподобия (maximum likelihood estimation)
 MP – матриксный белок (matrix protein)
 NA – нейраминидаза
 NEP – белок ядерного экспорта (nuclear export protein)
 NP – нуклеопротеид
 NS – неструктурный белок
 NS1 – неструктурный белок 1
 NS2 – неструктурный белок 2
 PA – полимеразный белок
 PB1 – полимеразный белок 1
 PB2 – полимеразный белок 2

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, А.Ю. Анализ миграций птиц водного и околоводного комплекса на территории республики Дагестан и обоснование выбора ключевых точек мониторинга гриппа типа А / А.Ю. Алексеев, Т.А. Мурашкина, Д.М. Джамалутдинов // Юг России: экология, развитие. – 2019. – №. 1. – С. 137-149.
2. Алексеев, А.Ю. Мониторинг РНК-содержащих орто- и парамиксовирусов у водных млекопитающих и птиц Республики Дагестан / А.Ю. Алексеев, К.А. Шаршов, А.А. Гаджиев, И.А. Соболев, А.А. Дерко, Т.А. Мурашкина // Морские млекопитающие Голарктики: сб. тезисов X-ой Междунар. конф., посвящ. памяти А.В. Яблокова. – Архангельск, 2018. – С. 13-14.
3. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев // М.: Медгиз, 1962. – 180 с.
4. Вилков, Е.В. Видовой состав и особенности территориального распределения птиц в Предгорном Дагестане / Е.В. Вилков // Юг России: экология, развитие. – 2019. – №. 2. – С. 9-34.
5. Вилков, Е.В. Лагуны Дагестана и их влияние на орнитологические комплексы аридных побережий западного Каспия / Е.В. Вилков // Аридные экосистемы. – 2003. – Т. 9, №. 19-20. – С. 65-78.
6. Вилков, Е.В. Лагуны Дагестана как модель трансформации морских побережий в условиях трансгрессии Каспия и их роль в сохранении птиц палеарктики / Е.В. Вилков // Вестник Дагестанского научного центра РАН. – 2017. – №. 65. – С. 43-53.
7. Вилков, Е.В. Специфика миграций птиц в районе лагун западного побережья Среднего Каспия / Е.В. Вилков // Аридные экосистемы. – 2006. – Т. 12, №. 29. – С. 63-76.
8. Водно-болотные угодия России. Федеральный экологический совет. Доступно по ссылке: <https://www.fesk.ru/>. Дата обращения: [21.08.2024].

9. Гаджиев, М.Д. Оценка экономической эффективности мероприятий по экологической реабилитации озера Южный Аграхан / М.Д. Гаджиев, М.А. Гуруев // Региональные проблемы преобразования экономики. – 2013. – №. 4 (38). – С. 318-325.
10. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, В.И. Плешакова // М.: Лань, 2018. – 500 с.
11. Дерко, А.А. Парамиксовирус птиц APMV-4, выделенный от кряквы обыкновенной (*Anas platyrhynchos*, Linnaeus, 1758): первый случай обнаружения в Западном Прикаспии / А.А. Дерко, Н.А. Дубовицкий, Т.А. Мурашкина // Юг России: экология, развитие. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 81-87.
12. Ильичева, Т.Н. Репродукция вируса гриппа человека и иммунопатогенез вызываемого им заболевания / Т.Н. Ильичева, С.И. Бажан, А.М. Шестопалов, С.В. Нетесов // Инфекционные болезни. – 2012. – Т. 10, №. 4. – С. 59-66.
13. Козлова, В.А. Современные подходы к транспортировке биообразцов при низких температурах / В.А. Козлова, М.С. Покровская, А.Н. Мешков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, №. 10. – С. 619-625.
14. Кривенко, В.Г. Водно-болотные угодья России / В.Г. Кривенко // М.: Wetlands International. – 2000. – Т. 3. – С. 490.
15. Кузнецов, О.К. Условия, способствующие появлению вируса гриппа с пандемическими потенциями. Профилактические меры / О.К. Кузнецов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2003. – №. 3. – С. 5-12
16. Кумари, Э.В. К теории пролетных путей и миграции широким фронтом / Э.В.К. Кумари // Русский орнитологический журнал. – 2020. – Т. 29, №. 1901. – С. 1276-1286.
17. Литусов, Н.В. Структура и репродукция вирусов: иллюстрированное учебное пособие / Н.В. Литусов, А.В. Устюжанин // Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2012. – С. 29.

18. Мурашкина, Т.А. Итоги мониторинга вируса гриппа у диких птиц западного побережья Среднего Каспия за 2017-2020 гг. / Т.А. Мурашкина, А.А. Дерко, Н.А. Дубовицкий // Влияние изменения климата на биологическое разнообразие и распространение инфекций в Черноморско-Каспийском регионе: материалы XXV Междунар. науч. конф. с элементами школы для молодых ученых. – Махачкала, 2023. – С. 349.
19. Мурашкина, Т.А. РНК-вирусы водоплавающих и околоводных птиц Северо-Западного Прикаспия / Т.А. Мурашкина // Материалы 57-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2019: Биология / Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2019. – С. 24.
20. Мурашкина, Т.А. Циркуляция вирусов гриппа у диких птиц северо-западного Прикаспия / Т.А. Мурашкина // МНСК-2018: Биология, 2018. – С. 169.
21. О гидроэкологическом состоянии Аграханского залива и возможности его улучшения / Д.В. Магрицкий [и др.] // Аридные экосистемы – 2022. – Т. 28, №. 4. – С. 163-178.
22. Пашков, Е.П. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Е.П. Пашков, А.В. Караулов, М.Я. Корн // М: Медицинское информационное агентство, – 2003. – С.236.
23. Расулова, М.М. Современное трофическое состояние озера Аджи (Папас) / М.М. Расулова, Г.А. Ахмедова // Вестник Дагестанского государственного университета. Серия 1: Естественные науки. – 2011. – №. 1. – С. 120-123.
24. Саяпина, Л.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций / Л.В. Саяпина, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – №. 2. – С. 107-110.
25. Соболев, И.А. Изменчивость вируса гриппа типа А / И.А. Соболев, О.Г. Курская, К.А. Шаршов // Юг России: экология, развитие. – 2016. – №. 1. – С. 170-177.

26. Тимофеева, Т.А. Мутации в геноме вирусов гриппа птиц подтипов H1 и H5, ответственные за адаптацию к млекопитающим / Т.А. Тимофеева, И.А. Руднева, Н.Ф. Ломакина // *Microbiology Independent Research journal*. – 2021. – Т. 8, №. 1. – С. 68-79.
27. Шаршов, К.А. Результаты мониторинга вируса гриппа у диких птиц на территории республики Дагестан (осень 2017 – весна 2018 гг.) / К.А. Шаршов, А.Ю. Алексеев, Т.А. Мурашкина // Биологическое разнообразие Кавказа и юга России: материалы XX Юбилейной Международной науч. конф., посвящ. памяти выдающегося ученого, д-ра биол. наук, Заслуженного деятеля науки РД и РФ, акад. Российской экологической академии, проф. Гайирбега Магомедовича Абдурахманова. – Махачкала, 2018. – С. 531.
28. Шаршов, К.А. Экологическое разнообразие диких птиц-естественного резервуара вируса гриппа А на юге Западной Сибири / К.А. Шаршов, Л. Синьсинь, А.К. Юрлов // *Юг России: экология, развитие*. – 2016. – №. 4. – С. 56-65.
29. Эпизоотия среди лебедей-шипунцов (*Cygnus olor*) в нижней дельте Волги (ноябрь 2005 г.), вызванная высокопатогенным вирусом гриппа А/Н5N1 / Д.К. Львов [и др.] // *Вопросы вирусологии*. – 2006. – Т. 51. – №. 3. – С. 10-16.
30. Abbas, M.A. Sequence and phylogenetic analysis of H7N3 avian influenza viruses isolated from poultry in Pakistan 1995-2004 / M.A. Abbas, E. Spackman, D.E. Swayne // *Virology Journal*. – 2010. – Vol. 7. – P. 1-10.
31. Abdelwhab, E.M. Prevalence and control of H7 avian influenza viruses in birds and humans / E.M. Abdelwhab, J. Veits, T.C. Mettenleiter // *Epidemiology and infection*. – 2014. – Vol. 142. – №. 5.
32. Akarsu, H. Structure-based design of NS2 mutants for attenuated influenza A virus vaccines / H. Akarsu, K. Iwatsuki-Horimoto, T. Noda // *Virus Research*. – 2011. – Vol. 155. – №. 1. – P. 240-248.

33. Alexander, D.J. An overview of the epidemiology of avian influenza / Alexander D.J // Vaccine. – 2007. – Vol. 25. – №. 30. – P.5637-5644.
34. Alexander, D.J. Recent zoonoses caused by influenza A viruses / D.J. Alexander, I.H. Brown // Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics). – 2000. – Vol. 19. – №. 1. – P. 197-225.
35. Arzey, G.G. Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia / G.G. Arzey, P.D. Kirkland, K.E. Arzey // Emerging infectious diseases. – 2012. – Vol. 18. – №. 5. – P. 814.
36. Barberis, A. Full-length genome sequences of the first H9N2 avian influenza viruses isolated in the Northeast of Algeria / A. Barberis, A. Boudaoud, A. Gorrill // Virology journal. – 2020. – Vol. 17. – P. 1-16.
37. Barr, I.G. WHO recommendations for the viruses used in the 2013–2014 Northern Hemisphere influenza vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A (H1N1) pdm09, A (H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013 / I.G. Barr, C. Russell, T.G. Besselaar // Vaccine. – 2014. – №. 37, Vol. 32. – P. 4713-4725.
38. Blagodatski, A. Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology / A. Blagodatski, K. Trutneva, O. Glazova // Pathogens. – 2021. – Vol. 10. – P.630.
39. Bodewes, R. Spatiotemporal analysis of the genetic diversity of seal influenza A (H10N7) virus, northwestern Europe / R. Bodewes, S. Zohari, J.S. Krog // Journal of virology. – 2016. – Vol. 90. – №. 9. – P. 4269-4277.
40. Bogs, J. Reversion of PB2-627E to-627K during replication of an H5N1 Clade 2.2 virus in mammalian hosts depends on the origin of the nucleoprotein / J. Bogs, D. Kalthoff, J. Veits // Journal of virology. – 2011. – Vol. 85. – №. 20. – P. 10691-10698.
41. Bouvier N.M. Animal models for influenza virus pathogenesis and transmission / N.M. Bouvier, A.C. Lowen // Viruses. – 2010. – Vol. 2. – №.8. – P. 1530-1565.

- 42.Brand, J.M.A. Wild ducks excrete highly pathogenic avian influenza virus H5N8 (2014–2015) without clinical or pathological evidence of disease / J.M. Brand, J.H. Verhagen, E.J. Veldhuis Kroeze // *Emerging microbes & infections*. – 2018. – Vol. 7. – №. 1. – P. 1-10.
- 43.Bridge, E.S. Bird migration and avian influenza: A comparison of hydrogen stable isotopes and satellite tracking methods / E.S. Bridge, J.F. Kelly, X. Xiao // *Ecological indicators*. – 2014. – Vol. 45. – P. 266-273.
- 44.Bui, V.N. Genetic characterization of a rare H12N3 avian influenza virus isolated from a green-winged teal in Japan / V.N. Bui, H. Ogawa, I.T. Hussein // *Virus Genes*. – 2015. – Vol. 50. – P. 316-320.
45. Byrd-Leotis, L. The interplay between the host receptor and influenza virus hemagglutinin and neuraminidase / L. Byrd-Leotis, R.D. Cummings, D.A. Steinhauer // *International journal of molecular sciences*. – 2017. – Vol. 18. – №. 7. – P. 1541.
46. Campitelli, L. Interspecies transmission of an H7N3 influenza virus from wild birds to intensively reared domestic poultry in Italy / L. Campitelli, E. Mogavero, M.A. De Marco // *Virology*. – 2004. – Vol. 323. – №. 1. – P. 24-36.
47. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Genetic Evolution of H7N9 Virus in China, 2013. Доступно на: <https://www.cdc.gov/flu/pdf/avianflu/h7n9-reassortment-diagram.pdf> . (дата обращения: 21.08.2024)
48. Cerda-Armijo, C. High prevalence of avian influenza virus among wild waterbirds and land birds of Mexico / C. Cerda-Armijo, M.B. De León, I. Ruvalcaba-Ortega // *Avian Diseases*. – 2020. – Vol. 64. – №. 2. – P. 135-142.
- 49.Chang, P. Characterization of the haemagglutinin properties of the H5N1 avian influenza virus that caused human infections in Cambodia / P. Chang, J. Yang, T.K. Karunarathna // *Emerging Microbes & Infections*. – 2023. – Vol. 12. – №. 2. – P. 2244091.

50. Chatziprodromidou, I.P. Global avian influenza outbreaks 2010–2016: A systematic review of their distribution, avian species and virus subtype / I.P. Chatziprodromidou, M. Arvanitidou, J. Guitian // Systematic reviews. – 2018. – Vol. 7. – C. 1-12.
51. Chen, H. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China / H. Chen, G. Deng, Z. Li // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 101. – №. 28. – P. 10452-10457.
52. Chen, H.Y. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study / H. Chen, H. Yuan, R. Gao // The Lancet. – 2014. – Vol. 383. – №. 9918. – P. 714-721.
53. Chen, L.J. Diversity, evolution and population dynamics of avian influenza viruses circulating in the live poultry markets in China / L.J. Chen, X.D. Lin, J.H. Tian // Virology. – 2017. – Vol. 505. – P. 33-41.
54. Chen, W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death / W. Chen, P.A. Calvo, D. Malide // Nature medicine. – 2001. – Vol. 7. – №. 12. – P. 1306-1312.
55. Cheng, D. A child with acute respiratory distress syndrome caused by avian influenza H3N8 virus / D. Cheng, Y. Dong, S. Wen // The Journal of Infection. – 2022. – Vol. 85. – №. 2. – P. 174-211.
56. Cheng, X. Surface glycoproteins of influenza A H3N2 virus modulate virus replication in the respiratory tract of ferrets / X. Cheng, J.R. Zengel, Q. Xu // Virology. – 2012. – Vol. 432. – №. 1. – P. 91-98.
57. Conenello, G.M. Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch / G.M. Conenello, P. Palese // Cell host & microbe. – 2007. – Vol. 2. – №. 4. – P. 207-209.
58. Couzens, L. An optimized enzyme-linked lectin assay to measure influenza A virus neuraminidase inhibition antibody titers in human sera / L. Couzens, J. Gao, K. Westgeest // Journal of virological methods. – 2014. – Vol. 210. – P. 7-14.

59. Cui, P. Bird migration and risk for H5N1 transmission into Qinghai Lake, China / P. Cui, Y. Hou, Z. Xing // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. – 2011. – Vol. 11. – №. 5. – P. 567-576.
60. Dalziel, A.E. Persistence of low pathogenic influenza A virus in water: a systematic review and quantitative meta-analysis / A.E. Dalziel, S. Delean, S. Heinrich // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – №. 10. – P. e0161929.
61. Darveau, A. Peptide mapping of 125I-labelled membrane protein of influenza viruses by reverse-phase high-performance liquid chromatography / N.G. Seidah, M. Chretien, J. Lecomte // *Journal of Virological Methods*. – 1982. – Vol. 4. – №. 2. – P. 77-85.
62. DeDiego, M.L. Directed selection of amino acid changes in the influenza hemagglutinin and neuraminidase affecting protein antigenicity / M.L. DeDiego, K. Chiem, D.J. Topham // *Vaccine*. – 2018. – Vol. 36. – №. 43. – P. 6383-6392.
63. Deng, G. Genetics, receptor binding, and virulence in mice of H10N8 influenza viruses isolated from ducks and chickens in live poultry markets in China / G. Deng, J. Shi, J. Wang // *Journal of virology*. – 2015. – Vol. 89. – №. 12. – P. 6506-6510.
64. Dhingra, M.S. Geographical and historical patterns in the emergences of novel highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5 and H7 viruses in poultry / M.S. Dhingra, J. Artois, S. Dellicour // *Frontiers in veterinary science*. – 2018. – Vol. 5. – P. 84.
65. Diskin, E.R. Subtype diversity of influenza A virus in North American waterfowl: a multidecade study / E. R. Diskin, K. Friedman, S. Krauss // *Journal of Virology*. – 2020. – Vol. 94. – №. 11. – P. 10-1128.
66. Dou, D. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement / D. Dou, R. Revol, H. Östbye // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1581.
67. Ellis, T.M. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002 / T. M.

- Ellis, R. Barry Bousfield, L.A. Bissett // *Avian Pathology*. – 2004. – Vol. 33. – №. 5. – P. 492-505.
68. El-Shesheny, R. Genetic characterization and pathogenic potential of H10 avian influenza viruses isolated from live poultry markets in Bangladesh / R. El-Shesheny, J. Franks, B.M. Marathe // *Scientific Reports*. – 2018. – T. 8. – №. 1. – P. 10693.
69. Englund, L. Studies on influenza viruses H10N4 and H10N7 of avian origin in mink / L. Englund // *Veterinary microbiology*. – 2000. – Vol. 74. – №. 1-2. – P. 101-107.
70. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Chinese-origin H7N9 avian influenza spread in poultry and human exposure: Qualitative risk assessment update. 2019. доступно на: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/2a455d95-ed8c-47cf-ad95-94260a097ddd/content> (дата обращения: 21.08.2024).
71. Feare, C.J. Asymptomatic infection with highly pathogenic avian influenza H5N1 in wild birds: how sound is the evidence? / C.J. Feare, M. Yasué // *Virology Journal*. – 2006. – Vol. 3. – P. 1-4.
72. Fereidouni S.R. Highly pathogenic avian influenza virus infection of mallards with homo- and heterosubtypic immunity induced by low pathogenic avian influenza viruses / S.R. Fereidouni, E. Starick, M. Beer // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4. – №. 8. – P. e6706
73. Fouchier, R.A.M. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls / R.A. Fouchier, V. Munster, A. Wallensten // *Journal of virology*. – 2005. – Vol. 79. – №. 5. – P. 2814-2822.
74. Fourment, M. The impact of migratory flyways on the spread of avian influenza virus in North America / M. Fourment, A.E. Darling, E.C. Holmes // *BMC evolutionary biology*. – 2017. – Vol. 17. – P. 1-12.
75. Garcia, V. Comparative dynamics and distribution of influenza drug resistance acquisition to protein m2 and neuraminidase inhibitors / V. Garcia,

- S. Aris-Brosou // *Molecular biology and evolution*. – 2014. – Vol. 31. – №. 2. – P. 355-363.
76. García-Sastre, A. The neuraminidase of bat influenza viruses is not a neuraminidase / A. García-Sastre // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – №. 46. – P. 18635-18636.
77. Gilbert, M. Free-grazing ducks and highly pathogenic avian influenza, Thailand / M. Gilbert, P. Chaitaweesub, T. Parakamawongsa // *Emerging infectious diseases*. – 2006. – Vol. 12. – №. 2. – P. 227.
78. Global Consortium for H5N8 and Related Influenza Viruses. Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8 / Global Consortium for H5N8 and Related Influenza Viruses // *Science* 2016. – Vol. 354 – №. 6309 – P. 213-217.
79. Globig, A. Ducks as sentinels for avian influenza in wild birds / A. Globig // *Emerging infectious diseases*. – 2009. – Vol. 15. – №. 10. – P. 1633.
80. Gubareva, L.V. M2 and neuraminidase inhibitors: anti-influenza activity, mechanisms of resistance, and clinical effectiveness / L.V. Gubareva, F.G. Hayden // *Influenza virology: current topics*. – 2006. – P. 169-202.
81. Gulyaeva, M. Characterization of avian-like influenza A (H4N6) virus isolated from Caspian Seal in 2012 / M. Gulyaeva, I. Sobolev, K. Sharshov // *Virologica Sinica*. – 2018. – Vol. 33. – P. 449-452.
82. Hale, B.G. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses / B.G. Hale, R.E. Randall, J. Ortín // *Journal of general virology*. – 2008. – Vol. 89. – №. 10. – P. 2359-2376.
83. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T.A. Hall // *Nucleic acids symposium series* – 1999. – Vol. 41. – №. 41. – P. 95-98.
84. Hansbro, P.M. Surveillance and analysis of avian influenza viruses, Australia / P.M. Hansbro, S. Warner, J.P. Tracey // *Emerging infectious diseases*. – 2010. – Vol. 16. – №. 12. – P. 1896.

85. Harrington, W.N. The evolution and future of influenza pandemic preparedness / W.N. Harrington, C.M. Kackos, R.J Webby // *Experimental & molecular medicine*. – 2021. – Vol. 53. – №. 5. – P. 737-749.
86. Hassan, M.M. Prevalence and distribution of avian influenza viruses in domestic ducks at the waterfowl-chicken interface in Wetlands / M.M. Hassan, A. Islam, R.B. Hasan // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9. – №. 11. – P. 953.
87. Hesterberg, U. Avian influenza surveillance in wild birds in the European Union in 2006 / U. Hesterberg, K. Harris, D. Stroud // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2009. – Vol. 3. – №. 1. – P. 1-14.
88. Hill, N.J. Migration strategy affects avian influenza dynamics in mallards (*Anas platyrhynchos*) / N.J. Hill, J.Y. Takekawa, J.T. Ackerman // *Molecular Ecology*. – 2012. – Vol. 21. – №. 24. – P. 5986-5999.
89. Hiono, T. Genetic and antigenic characterization of H5 and H7 influenza viruses isolated from migratory water birds in Hokkaido, Japan and Mongolia from 2010 to 2014 / T. Hiono // *Virus Genes*. – 2015. – Vol. 51. – P. 57-68.
90. Hooper, K.A. A mutant influenza virus that uses an N1 neuraminidase as the receptor-binding protein / K.A. Hooper, J.D. Bloom // *Journal of virology*. – 2013. – Vol. 87. – №. 23. – P. 12531-12540.
91. Hu, J. Crucial role of PA in virus life cycle and host adaptation of influenza A virus / J. Hu, X. Liu // *Medical Microbiology and Immunology*. – 2015. – Vol. 204. – P. 137-149.
92. Hu, J. PA-X: a key regulator of influenza A virus pathogenicity and host immune responses / J. Hu, C. Ma, X. Liu // *Medical microbiology and immunology*. – 2018. – Vol. 207. – №. 5. – P. 255-269.
93. Hu, M. Coexistence of avian influenza virus H10 and H9 subtypes among chickens in live poultry markets during an outbreak of infection with a novel H10N8 virus in humans in Nanchang, China / M. Hu, X. Li, X. Ni //

- Japanese Journal of Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 68. – №. 5. – P. 364-369.
94. Hulse-Post, D.J. Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks / D.J. Hulse-Post, J. Franks, K. Boyd // Journal of virology. – 2007. – Vol. 81. – №. 16. – P. 8515-8524.
 95. Hurt, A.C. Ecology and evolution of avian influenza viruses / A. C. Hurt, R.A.M. Fouchier, D. Vijaykrishna // Genetics and Evolution of Infectious Diseases (Second Edition). – 2017. – P.621-640.
 96. Hutchinson, E.C. Influenza virus / E.C. Hutchinson // Trends in microbiology. – 2018. – Vol. 26. – №. 9. – P. 809-810.
 97. Hyland, L. Influenza virus NS1 protein protects against lymphohematopoietic pathogenesis in an in vivo mouse model / L. Hyland, R. Webby, M.R. Sandbulte // Virology. – 2006. – Vol. 349. – №. 1. – P. 156-163.
 98. Imai, M. Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals / M. Imai, S. Herfst, E.M. Sorrell // Virus research. – 2013. – Vol. 178. – №. 1. – P. 15-20.
 99. Jagger, B.W. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response / B.W. Jagger, H.M. Wise, J.C. Kash // Science. – 2012. – Vol. 337. – P. 199-204.
 100. Javanian, M. A brief review of influenza virus infection / M. Javanian, M. Barary, S. Ghebrehewet // Journal of Medical Virology. – 2021. – Vol. 93. – №. 8. – P. 4638-4646.
 101. Jiao, P. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice / P. Jiao, G. Tian, Y. Li // Journal of virology. – 2008. – Vol. 82. – №. 3. – P. 1146-1154.
 102. Jimenez-Bluhm, P. Circulation of influenza in backyard productive systems in central Chile and evidence of spillover from wild birds / P.

- Jimenez-Bluhm, F. Di Pillo // Preventive veterinary medicine. – 2018. – Vol. 153. – P. 1-6.
103. Jones, B. Spreading the word about seasonal influenza / B. Jones // Bulletin of the World Health Organization. – 2012. – Vol. 90. – №. 4. – P. 252-253.
 104. Jones, Y.L. Comparative pathobiology of low and high pathogenicity H7N3 Chilean avian influenza viruses in chickens / Y.L. Jones, D.E. Swayne // Avian Diseases. – 2004. – Vol. 48. – №. 1. – P. 119-128.
 105. Joseph, U. The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission / U. Joseph, Y. C. Su, D. Vijaykrishna // Influenza and other respiratory viruses. – 2017. – Vol. 11. – №. 1. – P. 74-84.
 106. Kang, H.M. Novel reassortant influenza A (H5N8) viruses among inoculated domestic and wild ducks, South Korea, 2014 / H.M. Kang, E.K. Lee, B.M. Song // Emerging infectious diseases. – 2015. – Vol. 21. – №. 2. – P. 298.
 107. Kapczynski, D.R. Protection of commercial turkeys following inactivated or recombinant H5 vaccine application against the 2015 US H5N2 clade 2.3. 4.4 highly pathogenic avian influenza virus / D.R. Kapczynski, M.J. Sylte, M.L. Killian // Veterinary immunology and immunopathology. – 2017. – Vol. 191. – P. 74-79.
 108. Karlsson Hedestam, G.B. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus / G.B. Karlsson Hedestam, R.A. Fouchier // Nature Reviews Microbiology. – 2008. – Vol. 6. – №. 2. – P. 143-155.
 109. Kayed, A.E. Comparative pathogenic potential of avian influenza H7N3 viruses isolated from wild birds in Egypt and their sensitivity to commercial antiviral drugs / A.E. Kayed, O. Kutkat, A. Kandeil // Archives of Virology. – 2023. – Vol. 168. – №. 3. – P. 82.
 110. Kendal, A.P. Antigenic similarity of influenza A (H1N1) viruses from epidemics in 1977–1978 to “Scandinavian” strains isolated in epidemics of

- 1950–1951 / A.P. Kendal, G.R. Noble, J.J. Skehel // *Virology*. – 1978. – Vol. 89. – №. 2. – P. 632-636.
111. Kilbourne, E.D. Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase / E.D Kilbourne, W.G. Laver, J.L. Schulman // *Journal of virology*. – 1968. – Vol. 2. – №. 4. – P. 281-288.
 112. Killian, M.L. Hemagglutination assay for influenza virus / M.L. Killian // *Animal influenza virus*. – 2014. – P. 3-9.
 113. Kim, H.R. Characterization of H10 subtype avian influenza viruses isolated from wild birds in South Korea / H.R. Kim, Y.J. Lee, J.K. Oem // *Veterinary microbiology*. – 2012. – Vol. 161. – №. 1-2. – P. 222-228.
 114. Kim, M.J. Human influenza viruses activate an interferon-independent transcription of cellular antiviral genes: outcome with influenza A virus is unique / M.J. Kim, A.G. Latham, R.M. Krug // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – Vol. 99. – №. 15. – P. 10096-10101.
 115. Koel, B.F. Antigenic variation of clade 2.1 H5N1 virus is determined by a few amino acid substitutions immediately adjacent to the receptor binding site / B.F. Koel, D.F. Burke, T.M. Bestebroer // *MBio*. – 2014. – Vol. 5. – №.3. – P. 10–1128.
 116. Koel, B.F. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution / B.F. Koel, D.F. Burke, T.M. Bestebroer // *Science*. – 2013. – Vol. 342. – №. 6161. – P. 976-979.
 117. Kordyukova, L.V. Matrix proteins of enveloped viruses: a case study of Influenza A virus M1 protein / L.V. Kordyukova, E.V. Shtykova, L.A. Baratova // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* – 2019. – Vol. 37. – №. 3. – P. 671-690.
 118. Krammer, F. Influenza. / F. Krammer, G.J.D. Smith, R.A.M. Fouchier // *Nat Rev Dis Primers*. – 2018. – Vol. 4. – №1. – P.4.
 119. Krejcova, L. Structure of influenza viruses, connected with influenza life cycle / L. Krejcova, P. Michalek, D. Hynek // *J Metallomics Nanotechnol*. – 2015. – Vol. 2. – №. 1. – P. 13-19.

120. Krog, J.S. Influenza A (H10N7) virus in dead harbor seals, Denmark / J.S. Krog, M. Hansen, E. Holm // *Emerging infectious diseases*. – 2015. – Vol. 21. – №. 4. – P. 684.
121. Krug, R.M. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense / R.M. Krug // *Current opinion in virology*. – 2015. – Vol. 12. – P. 16.
122. Kuchipudi, S. Sialic acid receptors: the key to solving the enigma of zoonotic virus spillover / S.V. Kuchipudi, R.K. Nelli, A. Gontu // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – №. 2. – P. 262.
123. Lai, S. Global epidemiology of avian influenza A H5N1 virus infection in humans, 1997–2015: a systematic review of individual case data / S. Lai, Y. Qin, B. J. Cowling // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 16. – №. 7. – P. e108-e118.
124. Lamb, R.A. The gene structure and replication of influenza virus / R.A. Lamb, P.W. Choppin // *Annual review of biochemistry*. – 1983. – Vol. 52. – №. 1. – P. 467-506.
125. Le, T.B. Development of a multiplex RT-qPCR for the detection of different clades of avian influenza in poultry / T.B. Le, H.K. Kim, W. Na // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – №. 1. – P. 100.
126. Lee, D.H. Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds / D.H. Lee, M.K. Torchetti, K. Winker // *Journal of virology*. – 2015. – Vol. 89. – №. 12. – P. 6521-6524.
127. Lee, Y.J. Novel reassortant influenza A (H5N8) viruses, South Korea, 2014 / Y. J. Lee, H. M. Kang, E. K. Lee // *Emerging infectious diseases*. – 2014. – Vol. 20. – №. 6. – P. 1087.
128. Leung, B.W. Correlation between polymerase activity and pathogenicity in two duck H5N1 influenza viruses suggests that the polymerase contributes to pathogenicity / B.W. Leung, H. Chen, G.G. Brownlee // *Virology*. – 2010. – Vol. 401. – №. 1. – P. 96-106.

129. Lewis, N.S. Antigenic and genetic evolution of equine influenza A (H3N8) virus from 1968 to 2007 / N.S. Lewis, J.M. Daly, C.A. Russell // *Journal of virology*. – 2011. – Vol. 85. – №. 23. – P. 12742-12749.
130. Li, J. Single mutation at the amino acid position 627 of PB2 that leads to increased virulence of an H5N1 avian influenza virus during adaptation in mice can be compensated by multiple mutations at other sites of PB2 / J. Li, M. Ishaq, M. Prudence // *Virus research*. – 2009. – Vol. 144. – №. 1-2. – P. 123-129.
131. Li, R. Isolation of two novel reassortant H3N6 avian influenza viruses from long- distance migratory birds in Jiangxi Province, China / R. Li, T. Zhang, J. Xu // *Microbiologyopen*. – 2020. – Vol. 9. – №. 8. – P. e1060.
132. Li, X. High frequency of reassortment after co-infection of chickens with the H4N6 and H9N2 influenza A viruses and the biological characteristics of the reassortants / X. Li, B. Liu, S. Ma // *Veterinary microbiology*. – 2018. – Vol. 222. – P. 11-17.
133. Li, Z. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model / Z. Li, H. Chen, P. Jiao // *Journal of virology*. – 2005. – Vol. 79. – №. 18. – P. 12058-12064.
134. Liu, J. Genomic characteristics and phylogenetic analysis of the first H12N2 influenza A virus identified from wild birds, China / J. Liu, L. Zhou, Z. Luo // *Acta virologica*. – 2020. – Vol. 64. – №. 1.
135. Liu, J. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds / J. Liu, H. Xiao, F. Lei // *Science*. – 2005. – Vol. 309. – №. 5738. – P. 1206-1206.
136. Liu, S. Panorama phylogenetic diversity and distribution of type A influenza virus / S. Liu, K. Ji, J. Chen // *PloS one*. – 2009. – Vol. 4. – №. 3. – P. e5022.
137. Ludwig, S. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic / S. Ludwig, L. Stitz, O. Planz // *Virology*. – 1995. – Vol. 212. – P. 555-561.

138. Lv, X. H10Nx avian influenza viruses detected in wild birds in China pose potential threat to mammals / J. Tian, X. Li, X. Bai // *One Health*. – 2023. – Vol. 16. – P. 100515.
139. Lycett, S.J. A brief history of bird flu / S.J. Lycett, F. Duchatel, P. Digard // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. – 2019. – Vol. 374. – №. 1775. – P. 20180257.
140. Ma, C. Emergence and evolution of H10 subtype influenza viruses in poultry in China / C. Ma, T.T.Y. Lam, Y. Chai // *Journal of virology*. – 2015. – Vol. 89. – №. 7. – P. 3534-3541.
141. Ma, W. Swine influenza virus: Current status and challenge / W. Ma // *Virus research*. – 2020. – Vol. 288. – P. 198118.
142. Ma, W. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications / W. Ma, R.E. Kahn, J.A. Richt // *Journal of molecular and genetic medicine: an international journal of biomedical research*. – 2009. – Vol. 3. – №. 1. – P. 158.
143. Mänz, B. Adaptation of avian influenza A virus polymerase in mammals to overcome the host species barrier / B. Mänz, M. Schwemmler, L. Brunotte // *Journal of virology*. – 2013. – Vol.87. – №. 13. – P. 7200-7209.
144. Manzoor, R. Phylogenetic analysis of the M genes of influenza viruses isolated from free-flying water birds from their Northern Territory to Hokkaido, Japan / R. Manzoor, Y. Sakoda, A. Mweene // *Virus Genes*. – 2008. – Vol. 37. – P. 144-152
145. Mikami, T. Isolation of ortho-and paramyxoviruses from migrating feral ducks in Hokkaido / T. Mikami, H. Izawa, H. Kodama // *Archives of virology*. – 1982. – Vol. 74. – P. 211-217.
146. Mo, I.P. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity / I.P. Mo, M. Brugh, O.J. Fletcher // *Avian diseases*. – 1997. – P. 125-136.

147. Mulatti, P. H7N7 highly pathogenic avian influenza in poultry farms in Italy in 2016 / P. Mulatti, B. Zecchin, I. Monne // *Avian diseases.* – 2017. – Vol. 61. – №. 2. – P. 261-266.
148. Mundkur, T. A review of migratory bird flyways and priorities for management / T. Mundkur // *UNEP/CMS Secretariat.* – 2014.
149. Murashkina, T. Avian Influenza Virus and Avian Paramyxoviruses in Wild Waterfowl of the Western Coast of the Caspian Sea (2017–2020) / T. Murashkina, K. Sharshov, A. Gadzhiev // *Viruses.* – 2024. – Vol. 16. – №. 4. – P. 598.
150. Murashkina, T.A. Monitoring of Avian influenza virus in wild birds at the west coast of the Middle Caspian Sea, 2017-2020 / T.A. Murashkina // *V International scientific conference / Novosibirsk, 2023.* P. 21-22.
151. Muzyka, D. Isolation and genetic characterization of avian influenza viruses isolated from wild birds in the Azov-Black Sea region of Ukraine (2001–2012) / D. Muzyka, M. Pantin-Jackwood, E. Spackman // *Avian Diseases.* – 2016. – Vol. 60. – №. 1s. – P. 365-377.
152. Naguib, M.M. Global patterns of avian influenza A (H7): virus evolution and zoonotic threats / M.M. Naguib, J.H. Verhagen, A. Mostafa // *FEMS Microbiology Reviews.* – 2019. – Vol. 43. – №. 6. – P. 608-621.
153. Nakano, M. Ultrastructure of influenza virus ribonucleoprotein complexes during viral RNA synthesis / M. Nakano, Y. Sugita, N. Kodera // *Communications biology.* – 2021. – Vol. 4. – №. 1. – P. 858.
154. Nakayama, M. A novel H7N3 reassortant originating from the zoonotic H7N9 highly pathogenic avian influenza viruses that has adapted to ducks / M. Nakayama, Y. Uchida, A. Shibata // *Transboundary and emerging diseases.* – 2019. – Vol. 66. – №. 6. – P. 2342-2352.
155. Navarro-Lopez, R. Phylogenetic inference of the 2022 highly pathogenic H7N3 avian influenza outbreak in Northern Mexico / R. Navarro-Lopez, W. Xu, N. Gomez-Romero // *Pathogens.* – 2022. – Vol. 11. – №. 11. – P. 1284.

156. Noda, T. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles / T. Noda, H. Sagara, A. Yen // *Nature*. – 2006. – Vol. 439. – №. 7075. – P. 490-492.
157. Palese, P. *Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication* / P. Palese, M.L. Shaw // *Fields Virology*. 5th Edition. - 2001. – P. 1647-1689.
158. Pasick, J. Reassortant highly pathogenic influenza A H5N2 virus containing gene segments related to Eurasian H5N8 in British Columbia, Canada, 2014 / J. Pasick, Y. Berhane, T. Joseph // *Scientific reports*. – 2015. – Vol. 5. – №. 1. – P. 9484.
159. Perez, J.T. Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication / J.T. Perez, A. Varble, R. Sachidanandam // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – №. 25. – P. 11525-11530.
160. Pfeiffer, D.U. Implications of global and regional patterns of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 clades for risk management / D.U. Pfeiffer, M.J. Otte, D. Roland-Holst // *The Veterinary Journal*. – 2011. – Vol. 190. – №. 3. – P. 309-316.
161. Pielak, R.M. Influenza M2 proton channels / R.M. Pielak, J.J. Chou // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2011. – Vol. 1808. – №. 2. – P. 522-529.
162. Pyankova, O.G. Isolation of clade 2.3. 4.4 b A (H5N8), a highly pathogenic avian influenza virus, from a worker during an outbreak on a poultry farm, Russia, December 2020 / O.G. Pyankova, I.M. Susloparov, A.A. Moiseeva // *Eurosurveillance*. – 2021. – Vol. 26. – №. 24. – P. 2100439.
163. Qi, L. Contemporary avian influenza A virus subtype H1, H6, H7, H10, and H15 hemagglutinin genes encode a mammalian virulence factor similar to the 1918 pandemic virus H1 hemagglutinin / L. Qi, L.M. Pujanauski, A.S. Davis // *MBio*. – 2014. – Vol. 5. – №. 6. – P. 10.1128/mbio. 02116-14.

164. Qi, W. Emergence and adaptation of a novel highly pathogenic H7N9 influenza virus in birds and humans from a 2013 human-infecting low-pathogenic ancestor / W. Qi, W. Jia, D. Liu // *Journal of virology*. – 2018. – Vol. 92. – №. 2. – P. 10.1128/jvi. 00921-17.
165. Qi, W. Genesis of the novel human-infecting influenza A (H10N8) virus and potential genetic diversity of the virus in poultry, China / W. Qi, X. Zhou, W. Shi // *Eurosurveillance*. – 2014. – Vol. 19. – №. 25.
166. Rajão, D.S. Reassortment between swine H3N2 and 2009 pandemic H1N1 in the United States resulted in influenza A viruses with diverse genetic constellations with variable virulence in pigs / D.S. Rajão, R.R. Walia, B. Campbell // *Journal of virology*. – 2017. – Vol. 91. – №. 4. – P. e01763-16.
167. Reeves, A.B. Influenza A virus recovery, diversity, and intercontinental exchange: a multi-year assessment of wild bird sampling at Izembek National Wildlife Refuge, Alaska / A.B. Reeves, J.S. Hall, R.L. Poulson // *PloS one*. – 2018. – Vol. 13. – №. 4. – P. e0195327.
168. Rodriguez-Morales, A.J. Concerns about influenza H5N8 outbreaks in humans and birds: Facing the next airborne pandemic? / A.J. Rodriguez-Morales, D.K. Bonilla-Aldana, A.E. Paniz-Mondolfi // *Travel Medicine and Infectious Disease*. – 2021. – Vol. 41. – P. 102054.
169. Ruiz, S. Temporal dynamics and the influence of environmental variables on the prevalence of avian influenza virus in main wetlands in central Chile / S. Ruiz, P. Jimenez- Bluhm, F. Di Pillo // *Transboundary and emerging diseases*. – 2021. – Vol. 68. – №. 3. – P. 1601-1614.
170. Salomon, R. The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04/ R. Salomon, J. Franks, E. A. Govorkova // *Exp. Med.* 2006 – Vol. 203 – №. 3 – P. 689–697.

171. Sautto, G.A. Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal / G.A. Sautto, G.A. Kirchenbaum, T.M. Ross // *Virology journal*. – 2018. – Vol. 15. – №. 1. – P. 1-12.
172. Schneider, E.K. A portrait of the sialyl glycan receptor specificity of the H10 influenza virus hemagglutinin - a picture of an avian virus on the verge of becoming a pandemic? / E.K. Schneider, J. Li, T. Velkov // *Vaccines*. – 2017. – Vol. 5. – №. 4. – P. 51.
173. Sharshov, K. Characterization and phylodynamics of reassortant H12Nx viruses in Northern Eurasia / K. Sharshov, J. Mine, I. Sobolev // *Microorganisms*. – 2019. – Vol. 7. – №. 12. – P. 643.
174. Shi, B. Identifying key bird species and geographical hotspots of avian influenza A (H7N9) virus in China / B. Shi, X.M. Zhan, J.X. Zheng // *Infectious Diseases of Poverty*. – 2018. – Vol. 7. – P. 1-11.
175. Si, Y. Spatio-temporal dynamics of global H5N1 outbreaks match bird migration patterns / Y. Si, A.K. Skidmore, T. Wang // *Geospatial health*. – 2009. – Vol. 4. – №. 1. – P. 65-78.
176. Sims, L.D. Avian influenza in Hong Kong 1997–2002 / L.D. Sims, T.M. Ellis, K.K. Liu // *Avian diseases*. – 2003. – Vol. 47. – №. s3. – P. 832-838.
177. Sims, L.D. H5N8 Highly pathogenic avian influenza (HPAI) of Clade 2.3. 4.4 detected through surveillance of wild migratory birds in Tyva Republic, Russian Federation–potential for international spread / L. Sims, S. Khomenko, A. Kamata // - *Potential for International Spread* (Vol. 35). Rome: Empres Watch (2016) [Электронный ресурс].
178. Sloan, K.E. Nucleocytoplasmic transport of RNAs and RNA–protein complexes / K.E. Sloan, P.E. Gleizes, M.T. Bohnsack // *Journal of molecular biology*. – 2016. – Vol. 428. – №. 10. – P. 2040-2059.
179. Smith, A.M. Host- pathogen kinetics during influenza infection and coinfection: insights from predictive modeling / A.M. Smith // *Immunological reviews*. – 2018. – Vol. 285. – №. 1. – P. 97-112.

180. Smith, D.J. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus / D.J. Smith, A.S. Lapedes, J.C. De Jong // *Science*. – 2004. – Vol. 305. – P. 371-376.
181. Sobolev, I. Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Virus–Induced Mass Death of Wild Birds, Caspian Sea, Russia, 2022 / I. Sobolev, A. Gadzhiev, K. Sharshov // *Emerging Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 29. – №. 12. – P. 2528.
182. Song, M.S. Unique determinants of neuraminidase inhibitor resistance among N3, N7, and N9 avian influenza viruses / M.S. Song, B.M. Marathe, G. Kumar // *Journal of Virology*. – 2015. – Vol. 89. – №. 21. – P. 10891-10900.
183. Squires, R.B. Influenza research database: an integrated bioinformatics resource for influenza research and surveillance / R.B. Squires, J. Noronha, V. Hunt // *Influenza and other respiratory viruses*. – 2012. – Vol. 6. – №. 6. – P. 404-416.
184. Stallknecht, D.E. Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water / D.E. Stallknecht, M.T. Kearney, S.M. Shane // *Avian diseases*. – 1990. – P. 412-418.
185. Starick, E. Phylogenetic analyses of highly pathogenic avian influenza virus isolates from Germany in 2006 and 2007 suggest at least three separate introductions of H5N1 virus / E. Starick, M. Beer, B. Hoffmann // *Veterinary microbiology*. – 2008. – Vol. 128. – №. 3-4. – P. 243-252.
186. Sturm-Ramirez, K.M. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks / K.M. Sturm-Ramirez, T. Ellis, B. Bousfield // *Journal of virology*. – 2004. – Vol. 78. – №. 9. – P. 4892-4901.
187. Su, S. First evidence of H10N8 Avian influenza virus infections among feral dogs in live poultry markets in Guangdong province, China / S. Su, W. Qi, P. Zhou // *Clinical infectious diseases*. – 2014. – Vol.59. – №. 5. – P. 748-750.

188. Suarez, D.L. Influenza A virus / D.L. Suarez, S. Schultz-Cherry // *Animal influenza*. – 2016. – Vol. 24 – №. 2-3. – P. 1-30.
189. Sullivan, J.D. Waterfowl Spring migratory behavior and avian influenza transmission risk in the changing landscape of the east Asian-Australasian flyway / J.D. Sullivan, J.Y. Takekawa, K.A. Spragens // *Frontiers in Ecology and Evolution*. – 2018. – Vol. 6. – P. 206.
190. Suttie, A. Detection of low pathogenicity influenza A (H7N3) virus during duck mortality event, Cambodia, 2017 / A. Suttie, S. Yann, Y. Phalla // *Emerging infectious diseases*. – 2018. – Vol. 24. – №. 6. – P. 1103.
191. Suttie, A. Inventory of molecular markers affecting biological characteristics of avian influenza A viruses / A. Suttie, Y.M. Deng, A.R. Greenhill // *Virus Genes*. – 2019. – Vol. 55. – P. 739-768.
192. Takekawa, J.Y. Migration of waterfowl in the East Asian flyway and spatial relationship to HPAI H5N1 outbreaks / J.Y. Takekawa, S.H. Newman, X. Xiao // *Avian diseases*. – 2010. – Vol. 54. – №. s1. – P. 466-476.
193. Tang, L. Characterization of avian influenza virus H10–H12 subtypes isolated from wild birds in Shanghai, China from 2016 to 2019 / L. Tang, W. Tang, L. Ming // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – №. 10. – P. 1085.
194. Tanikawa, T. Pathogenicity of two novel human-origin H7N9 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens and ducks / T. Tanikawa, Y. Uchida, N. Takemae // *Archives of virology*. – 2019. – Vol. 164. – P. 535-545.
195. Tewawong, N. Assessing antigenic drift of seasonal influenza A (H3N2) and A (H1N1) pdm09 viruses / N. Tewawong, S. Prachayangprecha, P. Vichi wattana // *PloS one*. – 2015. – Vol. 10. – №. 10. – P. e0139958.
196. Thompson, J.D. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools / J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak // *Nucleic acids research*. – 1997. – Vol. 25. – №. 24. – P. 4876-4882.

197. Tian, H. Avian influenza H5N1 viral and bird migration networks in Asia / H. Tian, S. Zhou, L. Dong // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112. – №. 1. – P. 172-177.
198. Tong, S. A distinct lineage of influenza A virus from bats / S. Tong, Y. Li, P. Rivaller // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – №. 11. – P. 4269-4274.
199. Trinh, T.T.T. Genetic characterization and pathogenesis of avian influenza virus H7N3 isolated from spot-billed ducks in South Korea, early 2019 / T.T.T. Trinh, I. Tiwari, K. Durairaj // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – №. 5. – P. 856.
200. Trovão, N.S. Evolution of highly pathogenic H7N3 avian influenza viruses in Mexico / N.S. Trovão, G.A. Talavera, M.I. Nelson // *Zoonoses and Public Health*. – 2020. – Vol. 67. – №. 3. – P. 318-323.
201. Ulaankhuu, A. Genetic and antigenic characterization of H5 and H7 avian influenza viruses isolated from migratory waterfowl in Mongolia from 2017 to 2019 / A. Ulaankhuu, E. Bazarragchaa, M. Okamatsu // *Virus Genes*. – 2020. – Vol. 56. – P. 472-479.
202. Valley- Omar, Z. Human surveillance and phylogeny of highly pathogenic avian influenza A (H5N8) during an outbreak in poultry in South Africa, 2017 / Z. Valley- Omar, A. Cloete, R. Pieterse // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2020. – Vol. 14. – №. 3. – P. 266-273.
203. Van der Kolk, J.H. Role for migratory domestic poultry and/or wild birds in the global spread of avian influenza? / J.H. Van der Kolk // *Veterinary Quarterly*. – 2019. – Vol. 39. – №. 1. – P. 161-167.
204. Van Reeth, K. Influenza viruses / K. Van Reeth, A.L Vincent // *Diseases of swine*. – 2019. – Vol. 36. – P. 576-593.
205. Varble, A. Engineered RNA viral synthesis of microRNAs / A. Varble, M.A. Chua, J.T. Perez // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – №. 25. – P. 11519-11524.

206. Venkatesh, D. Avian influenza viruses in wild birds: virus evolution in a multihost ecosystem / D. Venkatesh, M.J. Poen, T.M. Bestebroer // *Journal of virology*. – 2018. – Vol. 92. – №. 15. – P. 10.1128/jvi. 00433-18.
207. Verhagen, J.H. Highly pathogenic avian influenza viruses at the wild–domestic bird interface in Europe: future directions for research and surveillance / J.H. Verhagen, R.A.M. Fouchier, N. Lewis // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – №. 2. – P. 212.
208. Verhagen, J.H. Wild bird surveillance around outbreaks of highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus in the Netherlands, 2014, within the context of global flyways / J.H. Verhagen, H.P. Jeugd, B.A. Nolet // *Eurosurveillance*. – 2015. – Vol. 20. – №. 12. – P. 21069.
209. Vicary, A.C. Maximal interferon induction by influenza lacking NS1 is infrequent owing to requirements for replication and export / A.C. Vicary, M. Mendes, S. Swaminath // *PLoS Pathogens*. – 2023. – Vol. 19. – №. 4. – P. e1010943
210. Videvall, E. Measuring the gut microbiome in birds: comparison of faecal and cloacal sampling / E. Videvall, M. Strandh, A. Engelbrecht // *Molecular ecology resources*. – 2018. – Vol. 18. – №. 3. – P. 424-434.
211. Vijaykrishna, D. The recent establishment of North American H10 lineage influenza viruses in Australian wild waterfowl and the evolution of Australian avian influenza viruses / D. Vijaykrishna, Y.M. Deng, Y.C. Su // *Journal of virology*. – 2013. – Vol. 87. – №. 18. – P. 10182-10189.
212. Vries, R.P. A single mutation in Taiwanese H6N1 influenza hemagglutinin switches binding to human- type receptors / R.P. Vries, N. Tzarum, W. Peng // *EMBO molecular medicine*. – 2017. – Vol. 9. – №. 9. – P. 1314-1325.
213. Wan, Z. Phylogeography and Biological Characterizations of H12 Influenza A Viruses / Z. Wan, Q. Kan, D. He // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – №. 10. – P. 2251.

214. Wang, N. Complete genome sequence of an H10N5 avian influenza virus isolated from pigs in central China / N. Wang, W. Zou, Y. Yang // American Society for Microbiology – 2012. – Vol. 86. – №. 24. – P. 13865-13866.
215. Wang, Y. Emergence, evolution, and biological characteristics of H10N4 and H10N8 avian influenza viruses in migratory wild birds detected in eastern China in 2020 / Y. Wang, M. Wang, H. Zhang // Microbiology Spectrum. – 2022. – Vol. 10. – №. 2. – P. e00807-22.
216. Weber, T.P. Ecologic immunology of avian influenza (H5N1) in migratory birds / T.P. Weber, N.I. Stilianakis // Emerging infectious diseases. – 2007. – Vol. 13. – №. 8. – P. 1139.
217. Wille, M. Where do all the subtypes go? Temporal dynamics of H8–H12 influenza A viruses in waterfowl / M. Wille, N. Latorre-Margalef, C. Tolf // Virus Evolution. – 2018. – Vol. 4. – №. 2. – P. vey025.
218. Wisedchanwet, T. Influenza A virus surveillance in live-bird markets: first report of influenza A virus subtype H4N6, H4N9, and H10N3 in Thailand / T. Wisedchanwet, M. Wongpatcharachai, S. Boonyapisitsopa // Avian Diseases. – 2011. – Vol. 55. – №. 4. – P. 593-602.
219. WOA. World Organization for Animal Health. Avian influenza. URL: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/web-portal-on-avianinfluenza> (дата обращения: 21.08.2024)
220. World Health Organization (WHO). Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A (H5N1) reported to WHO (2003-2024). Available: <https://www.who.int/publications/m/item/cumulativenumber-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a> (дата обращения: 21.08.2024)
221. World Health Organization (WHO, 2011). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011. ISBN: 9789241548090 (дата обращения: 21.08.2024)

222. World Health Organization (WHO, 2024). Pandemic Influenza Preparedness Framework. Available at: <https://www.who.int/europe/emergencies/emergencycycle/prepare/pandemic-influenza> (дата обращения: 21.08.2024)
223. World Organisation for Animal Health (WOAH). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2018. Доступно online: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf (дата обращения: 21.08.2024)
224. Wu, W. Binding of influenza viruses to sialic acids: reassortant viruses with A/NWS/33 hemagglutinin bind to $\alpha 2$, 8-linked sialic acid / W. Wu, G.M. Air // Virology. – 2004. – Vol. 325. – №. 2. – P. 340-350.
225. Xu, C. Amino acids 473V and 598P of PB1 from an avian-origin influenza A virus contribute to polymerase activity, especially in mammalian cells / C. Xu, W.B. Hu, K. Xu // Journal of general virology – 2012. – Vol. 93. – P. 531–540.
226. Xu, Y. Southward autumn migration of waterfowl facilitates cross-continental transmission of the highly pathogenic avian influenza H5N1 virus / Y. Xu, P. Gong, B. Wielstra // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – №. 1. – P. 30262.
227. Yang, W. Bat influenza viruses: Current status and perspective / W. Yang, T. Schountz, W. Ma // Viruses. – 2021. – Vol. 13. – №. 4. – P. 547.
228. Yeo, S. J. Molecular characterization of a novel avian influenza A (H2N9) strain isolated from wild duck in Korea in 2018 / S.J. Yeo, H.S. Park, H.W. Sung // Viruses. – 2019. – Vol. 11. – №. 11. – P. 1046.
229. Yoon, S.W. Evolution and ecology of influenza A viruses / S. W. Yoon, R. J. Webby, R G. Webster // Influenza pathogenesis and control-volume I. – 2014. – P. 359-375.
230. Youk, S. Highly pathogenic avian influenza A (H7N3) virus in poultry, United States, 2020 / S. Youk, D. H. Lee, M.L. Killian // Emerging Infectious Diseases. – 2020. – Vol. 26. – №. 12. – P. 2966.

231. Zhang, T. Human infection with influenza virus A (H10N8) from live poultry markets, China, 2014 / T. Zhang, H. Tian, X. Li // *Emerging infectious diseases*. – 2014. – Vol. 20. – №. 12. – P. 2076.
232. Zhang, Y. Genetic analysis and biological characterization of H10N3 influenza A viruses isolated in China from 2014 to 2021 / Y. Zhang, J. Shi, P. Cui // *Journal of Medical Virology*. – 2023. – Vol. 95. – №. 2. – P. e28476.
233. Zhou, J. Defining the sizes of airborne particles that mediate influenza transmission in ferrets / J. Zhou, J. Wei, K.T. Choy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – Vol. 115. – №. 10. – P. E2386-E2392.
234. Zinyakov, N. Analysis of Avian Influenza (H5N5) Viruses Isolated in the Southwestern European Part of the Russian Federation in 2020–2021 / N. Zinyakov, A. Andriyasov, P. Zhestkov // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – №. 12. – P. 2725.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Регистрационные номера нуклеотидных последовательностей генов вируса гриппа, депонированных в международной базе данных

Genbank

Номера доступа к нуклеотидным последовательностям в базе GISAID

Штамм	субтип	Isolate_Id	PB2 Segment_Id	PB1 Segment_Id	PA Segment_Id	HA Segment_Id	NP Segment_Id	NA Segment_Id	MP Segment_Id	NS Segment_Id
A/mallard/Dagestan/1050/2018	H7N3	EPI_ISL_331289	EPI1319312	EPI1319313	EPI1319311	EPI1319315	EPI1319308	EPI1319314	EPI1319310	EPI1319309
A/mallard/Dagestan/1051/2018	H7N3	EPI_ISL_331290	EPI1319320	EPI1319321	EPI1319319	EPI1319323	EPI1319316	EPI1319322	EPI1319318	EPI1319317
A/teal/Dagestan/1017/2018	H12N5	EPI_ISL_331307	EPI1319421	EPI1319422	EPI1319420	EPI1319424	EPI1319417	EPI1319423	EPI1319419	EPI1319418
A/teal/Dagestan/57d/2018	H8N4	EPI_ISL_337411	EPI1353389	EPI1353390	EPI1353388	EPI1353392	EPI1353385	EPI1353391	EPI1353387	EPI1353386
A/teal/Dagestan/44d/2018	H3N8	EPI_ISL_337413	EPI1353405	EPI1353406	EPI1353404	EPI1353408	EPI1353401	EPI1353407	EPI1353403	EPI1353402
A/teal/Dagestan/23d/2018	H3N8	EPI_ISL_339040	EPI1358857	EPI1358858	EPI1358856	EPI1358860	EPI1358853	EPI1358859	EPI1358855	EPI1358854
A/Common_Teal/Dagestan/34d/2019	H4N6	EPI_ISL_403716	EPI1657064	EPI1657065	EPI1657063	EPI1657067	EPI1657060	EPI1657066	EPI1657062	EPI1657061
A/mallard/Dagestan/004/2018	H10N5	EPI_ISL_18794371	EPI2934199	EPI2934200	EPI2934198	EPI2934202	EPI2934195	EPI2934201	EPI2934197	EPI2934196
A/gadwall/Dagestan/156/2017	H4N6	EPI_ISL_331287	EPI1319296	EPI1319297	EPI1319298	EPI1319299	EPI1319292	EPI1319298	EPI1319294	EPI1319293
A/pochard/Dagestan/92/2017	H3N8	EPI_ISL_331279	EPI1319232	EPI1319233	EPI1319231	EPI1319235	EPI1319228	EPI1319234	EPI1319230	EPI1319229
A/teal/Dagestan/120/2017	H3N8	EPI_ISL_331283	EPI1319264	EPI1319265	EPI1319263	EPI1319267	EPI1319260	EPI1319266	EPI1319262	EPI1319261
A/teal/Dagestan/141/2017	H3N8	EPI_ISL_331284	EPI1319272	EPI1319273	EPI1319271	EPI1319275	EPI1319268	EPI1319274	EPI1319270	EPI1319269
A/teal/Dagestan/59/2017	H3N8	EPI_ISL_331281	EPI1319248	EPI1319249	EPI1319247	EPI1319251	EPI1319244	EPI1319250	EPI1319246	EPI1319245
A/teal/Dagestan/670/2017	H3N8	EPI_ISL_331285	EPI1319280	EPI1319281	EPI1319279	EPI1319283	EPI1319276	EPI1319282	EPI1319278	EPI1319277
A/teal/Dagestan/82/2017	H3N8	EPI_ISL_331282	EPI1319256	EPI1319257	EPI1319255	EPI1319259	EPI1319252	EPI1319258	EPI1319254	EPI1319253
A/mallard/Dagestan/1092/2018	H1N1	EPI_ISL_331272	EPI1319183	EPI1319184	EPI1319182	EPI1319186	EPI1319179	EPI1319185	EPI1319181	EPI1319180
A/mallard/Dagestan/1093/2018	H1N1	EPI_ISL_331273	EPI1319191	EPI1319192	EPI1319190	EPI1319194	EPI1319187	EPI1319193	EPI1319189	EPI1319188

Приложение Б

Справки о депонировании



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**



ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирской области Телефон: (383) 363-47-00 Факс: (383) 336-74-09
E-mail: vector@vector.nsc.ru <http://www.vector.nsc.ru> ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 22.04.2019 № 1005/1929

На № _____ от _____

Справка о депонировании штамма
микроорганизма

СПРАВКА

Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа А штамм A/mallard/Novosibirsk region/963k/2018 (H3N2)
(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Шаршов К.А., Курская О.Г., Синьсинь Ли, Мурашкина Т.А.,
Соболев И.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Алексеев А.Ю.,
Шестопалов А.М..

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и
трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ)
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова 2.
Тел./ факс (383) 333-65-37

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-889**
Дата регистрации: 17.05.2019

Генеральный директор



Р.А. Максютов
Р.А. Максютов

Исп.: Булычев Л.Е.
Тел. (383) 363-47-00+21-74



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**



ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирской области Телефон: (383) 363-47-00 Факс: (383) 336-74-09
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 22.05.2019 № 1005/1926

На № _____ от _____

Справка о депонировании штамма
микроорганизма

СПРАВКА

Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа А штамм A/teal/Dagestan/59/2017 (H3N8)

(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Шаршов К.А., Курская О.Г., Мурашкина Т.А., Соболев И.А.,
Гаджиев А.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Алексеев А.Ю.,
Шестопапов А.М.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и
трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ)
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова 2.
Тел./ факс (383) 333-65-37

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-886**
Дата регистрации: 17.05.2019

Генеральный директор



Р.А. Максюттов

Исп.: Булычев Л.Е.
Тел. (383) 363-47-00+21-74



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**



ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирской области Телефон: (383) 363-47-00 Факс: (383) 336-74-09
E-mail: vector@vector.nsc.ru <http://www.vector.nsc.ru> ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 22.04.2019 № 1005/1928

На № _____ от _____

Справка о депонировании штамма
микроорганизма

СПРАВКА

Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа А штамм A/teal/Dagestan/120/2017 (H3N8)
(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Шаршов К.А., Курская О.Г., Мурашкина Т.А., Соболев И.А.,
Гаджиев А.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Алексеев А.Ю.,
Шестопалов А.М.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и
трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ)
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова 2.
Тел./ факс (383) 333-65-37
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-887**
Дата регистрации: 17.05.2019

Генеральный директор _____ Р.А. Максютов



Исп.: Булычев Л.Е.
Тел. (383) 363-47-00+21-74



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**



ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирской области Телефон: (383) 363-47-00 Факс: (383) 336-74-09
E-mail: vector@vector.nsc.ru <http://www.vector.nsc.ru> ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 22.08.2019 № 1005/1918

На № _____ от _____

Справка о депонировании штамма
микроорганизма

СПРАВКА

Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа А штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5)

(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Шаршов К.А., Курская О.Г., Мурашкина Т.А., Соболев И.А.,
Дерко А.А., Дубовицкий Н.А., Гаджиев А.А., Алексеев А.Ю.,
Шестопалов А.М.

Депозитор: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и
трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ)
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова 2.
Тел./ факс (383) 333-65-37

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-880**

Дата регистрации: 17.05.2019

Генеральный директор _____



_____ Р.А. Максютов

Исп.: Булычев Л.Е.
Тел. (383) 363-47-00+21-74



**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А.Смородинцева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

С П Р А В К А

Лаборатория эволюционной изменчивости вирусов гриппа отдела этиологии и эпидемиологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава России приняла в Коллекцию вирусов гриппа и ОРЗ на патентное депонирование следующие штаммы авулавирюсов:

I. Четыре штамма авулавирюсов птиц 1 типа

1. NDV/common teal/Sakhalin/Russia/OD30/2019 – присвоен номер **881**

Авторы штамма: Дёрко А.А., Шаршов К.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.

2. NDV/mallard/Primorje/Russia/34/2019 – присвоен номер **882**

Авторы штамма: Шаршов К.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.

3. NDV/gadwall/Buryatia/Russia/2210/2019 – присвоен номер **883**

Авторы штамма: Дёрко А.А., Шаршов К.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Мархаев А.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.

4. NDV/mallard/Dagestan/Russia/28d/2019 – присвоен номер **884**

Авторы штамма: Мурашкина Т.А., Шаршов К.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.

II. Три штамма авулавирюсов птиц 4 типа

1. APMV-4/common teal/Omsk Region/Russia/12/2019 – присвоен номер **885**

Авторы штамма: Шаршов К.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.

2. APMV-4/northern pintail/Primorje/Russia/276/2019 – присвоен номер **886**

Авторы штамма: Дёрко А.А., Шаршов К.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.

3. APMV-4/common teal/Buryatia/Russia/2240/2019 – присвоен номер **887**

Авторы штамма: Шаршов К.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Мархаев А.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.

III. Три штамма авулавирюсов птиц 6 типа

1. APMV-6/mallard/Primorje/Russia/32/2019 – присвоен номер **888**
Авторы штамма: Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Шаршов К.А., Соболев И.А.,
 Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.

2. APMV-6/common teal/Amur region/Russia/20b/2019 – присвоен номер **889**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А.,
 Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.

3. APMV-6/gadwall/Omsk Region/Russia/62/2019 – присвоен номер **890**
Авторы штамма: Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Шаршов К.А., Соболев И.А.,
 Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Мархаев А.Г., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.

Авторы штаммов:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
 «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И
 КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ» (НИИЭКМ)
 Адрес: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2
 Тел./факс приемной: (383) 333-64-56

Депозитор:

Музей вирусов гриппа и ОРЗ
 Лаборатория эволюционной изменчивости вирусов гриппа
 ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России
 Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17
 Тел.: (812) 499-15-22

Заведующий отделом этиологии и эпидемиологии



Д.М. Даниленко

Директор




Д.А. Лиознов



**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А.Смородинцева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

С П Р А В К А

Лаборатория эволюционной изменчивости вирусов гриппа отдела этиологии и эпидемиологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава России приняла в Коллекцию вирусов гриппа и ОРЗ на патентное депонирование следующие штаммы вирусов гриппа:

1. A/shoveler/Novosibirsk region/998k/2018 (H2N1) – присвоен номер **858**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Глущенко А.В., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
2. A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3) – присвоен номер **859**
Авторы штамма: Мурашкина Т.А., Шаршов К.А., Дёрко А.А., Глущенко А.В., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
3. A/teal/Dagestan/57d/2018 (H8N4) – присвоен номер **860**
Авторы штамма: Мурашкина Т.А., Шаршов К.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
4. A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5) – присвоен номер **861**
Авторы штамма: Мурашкина Т.А., Шаршов К.А., Дёрко А.А., Глущенко А.В., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
5. A/common teal/Chany Lake/357/2019 (H3N8) – присвоен номер **862**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Глущенко А.В., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
6. A/shoveler/Omsk Region/15/2019 (H4N6) – присвоен номер **863**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Мурашкина Т.А., Мархаев А.Г., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
7. A/common teal/Amur region/11b/2019 (H5N3) – присвоен номер **864**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
8. A/common teal/Amur region/76b/2019 (H6N2) – присвоен номер **865**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.

9. A/common gull/Omsk Region/8/2019 (H9N2) – присвоен номер **866**
Авторы штамма: Мурашкина Т.А., Шаршов К.А., Мархаев А.Г., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
10. A/common teal/Chany Lake /29/2019 (H14N3) – присвоен номер **867**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Глущенко А.В., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
11. A/gadwall/Buryatia/2221/2019 (H6N3) – присвоен номер **868**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
12. A/gadwall/Buryatia/2252/2019 (H12N5) – присвоен номер **869**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
13. A/mallard/Buryatia/44i/2019 (H6N1) – присвоен номер **870**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
14. A/shoveler/Chany Lake/68/2019 (H12N5) – присвоен номер **871**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Соболев И.А., Глущенко А.В., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
15. A/gadwall/Amur region/82b/2019 (H6N6) – присвоен номер **872**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
16. A/mallard/Russia_Primorje/74/2019 (H11N9) – присвоен номер **873**
Авторы штамма: Шаршов К.А., Дёрко А.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Дубовицкий Н.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
17. A/common teal/Russia_Primorje/94/2019 (H3N8) – присвоен номер **874**
Авторы штамма: Дубовицкий Н.А., Шаршов К.А., Дёрко А.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
18. A/mallard/Russia_Primorje/254/2019 (H11N9) – присвоен номер **875**
Авторы штамма: Дубовицкий Н.А., Шаршов К.А., Дёрко А.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Глущенко А.В., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
19. A/spot-billed duck/Russia_Primorje/262/2019 (H5N3) – присвоен номер **876**
Авторы штамма: Дубовицкий Н.А., Шаршов К.А., Дёрко А.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Глущенко А.В., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
20. A/spot-billed duck/Russia_Primorje/226/2019 (H5N3) – присвоен номер **877**
Авторы штамма: Дубовицкий Н.А., Шаршов К.А., Дёрко А.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Глущенко А.В., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.
21. A/spot-billed duck/Russia_Primorje/173/2019 (H6N1) – присвоен номер **878**
Авторы штамма: Дубовицкий Н.А., Шаршов К.А., Дёрко А.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Глущенко А.В., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.

22. A/mallard/Russia_Primorje/129/2019 (H6N6) – присвоен номер **879**

Авторы штамма: Соболев И.А., Дубовицкий Н.А., Дёрко А.А., Шаршов К.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.

23. A/chicken/Siberia/200-05/2018 (H9N2) – присвоен номер **880**

Авторы штамма: Шаршов К.А., Глущенко А.В., Дёрко А.А., Дубовицкий Н.А., Соболев И.А., Мурашкина Т.А., Курская О.Г., Алексеев А.Ю., Шестопапов А.М.

Авторы штаммов:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И
КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ» (НИИЭКМ)
Адрес: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2
Тел./факс приемной: (383) 333-64-56

Депозитор:

Музей вирусов гриппа и ОРЗ
Лаборатория эволюционной изменчивости вирусов гриппа
ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России
Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17
Тел.: (812) 499-15-22

Заведующий отделом этиологии и эпидемиологии

Д.М. Даниленко

Директор



Д.А. Лиюзов