

На правах рукописи

**Шаршов
Кирилл Александрович**

**ЭКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГРИППА
У ДИКИХ ПТИЦ В АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ (2007-2020)**

1.5.10 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Кольцово – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

Научный консультант: **Шестопалов Александр Михайлович**, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ

Официальные оппоненты: **Бабкин Игорь Викторович**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГБНУ Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Васин Андрей Владимирович, доктор биологических наук, профессор РАН, директор Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, директор Национального Центра по гриппу ВОЗ

Глотов Александр Гаврилович, доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией биотехнологии - диагностический центр, руководитель Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского федерального центра агробиотехнологий РАН (СФНЦА РАН)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А.Смординцева» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится «_09_» октября 2026 г. в 9-00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, д.б.н, доцент

Т.Н. Ильичева

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Вирус гриппа типа А (ВГА), по современной классификации относящийся к виду *Alphainfluenzavirus influenza*, является, пожалуй, наиболее изученным респираторным вирусом, имеющим значительную актуальность для мирового здравоохранения, сельского хозяйства и экономики.

С эволюционной точки зрения о вирусах гриппа известно много, и было получено больше данных о последовательностях, чем, о любой другой группе патогенов, за исключением распространившегося пандемического вируса SARS-CoV-2. Эти данные дали общее представление о степени и структуре генетического разнообразия вирусов, эволюционных процессах и мутациях, которые лежат в основе адаптации к хозяину, антигенного дрейфа и противовирусной устойчивости. Мы также много знаем о том, как вирусы гриппа человека распространяются и эволюционируют в зависимости от сезона циркуляции. Вирус гриппа А человека был в центре внимания одного из первых крупномасштабных проектов по секвенированию генома патогена (Ghedini et al., 2005), а геномы вируса гриппа регулярно используются для тестирования методов эволюционного анализа, и они все чаще применяются в качестве модели для понимания антигенного дрейфа и выбора вакцинных штаммов (Bedford et al., 2015; Neher et al., 2016).

К ключевым фундаментальным аспектам экологии и эволюции вирусов гриппа относятся способность к преодолению межвидового барьера, распространение на новые виды хозяев и способность быстро изменять антигенные свойства. При этом одной из главных причин генетического и антигенного разнообразия вируса гриппа является реассортация сегментов генома (Wille and Holmes, 2020). В настоящее время исследование движущих сил антигенной эволюции, разнообразия субтипов и генетических линий, эволюционной экологии вирусов в различных отдельных резервуарах является актуальной фундаментальной задачей.

Имея основной резервуар среди диких птиц, ряд вариантов ВГА обладает потенциалом преодоления межвидового барьера и перехода на широкий круг видов хозяев – диких и домашних птиц, млекопитающих, в том числе человека. В целом, очевидно, что субтипы ВГА различаются по специфичности к клеточным рецепторам и кругу хозяев, которых они могут заражать. Например, субтипы H13 и H16 на сегодняшний день обнаруживаются почти исключительно у чаек, в то время как более распространенные субтипы, такие как H3, встречаются у множества видов диких и домашних птиц, а также у людей, свиней, лошадей и собак (Crawford et al., 2005; Parrish et al., 2015).

Огромное значение имеет поиск и изучение зоонозных вариантов, регулярно поражающих человеческую популяцию. Согласно информации Всемирной организации здравоохранения, по состоянию на 09 мая 2026 г., было зарегистрировано 1000 случаев инфицирования людей вирусом гриппа птиц A/H5N1 в 25 странах мира, начиная с 2003 г., при этом 479 случаев закончились летальным исходом (WHO, 2026). Существуют и другие субтипы ВГА, распространенные у птиц, которые поражают человека (H3N8, H5N6, H6N1, H7N4, H7N9, H10N3 и H10N8) (Vi et al., 2024).

Таким образом, спектр видов птиц – хозяев ВГА и потенциал передачи между различными видами птиц и млекопитающих огромны. Существуют сложные закономерности, которые определяют основной спектр видов и таксономических групп птиц – распространенных хозяев низкопатогенных ВГА. Среди факторов следует отметить рецепторную специфичность, температурный оптимум ферментов вируса, генетические и физиологические особенности птиц-хозяев, экологические особенности и миграции популяций птиц, географическую распространенность.

На сезонность и годовые циклы циркуляции вируса гриппа среди диких птиц влияют несколько ключевых факторов, включая особенности миграции, условия окружающей среды и взаимодействие с хозяевами (Altizer et al., 2011; Harding et al., 2012). Вспышки высокопатогенного гриппа птиц в мире обычно начинаются в осенний период, достигая своего пика зимой. Эта закономерность тесно связана с миграционными циклами диких

птиц, особенно в регионах с умеренным климатом, где более холодные месяцы способствуют передаче вируса среди птиц и другим видам, включая домашнюю птицу и человека. Перелетные птицы служат естественными резервуарами вирусов гриппа птиц, распространяя их с миграциями. Совместное обитание различных видов птиц во время миграции повышает риск реассортации и передачи вируса.

Перспектива исследования пролетных путей имеет решающее значение для понимания того, как водоплавающие птицы способствуют сохранению вируса гриппа птиц на протяжении годовых циклов и, в конечном итоге, перемещению вируса по всему миру в зависимости от фактора сезонности. В связи с этим актуальным для нашего исследования было сравнение сезонной распространенности вируса у диких птиц в гнездовых ареалах азиатской части России (Северной Азии).

Вирусы гриппа птиц имеют сложную систему взаимодействующих резервуаров, где основным являются дикие водоплавающие птицы. Однако в последние годы внимание привлекают альтернативные, дополнительные резервуары этих вирусов. Существует гипотеза, что вспышка и массовая гибель среди диких и домашних птиц и эпизоотия гриппа среди лошадей в США и Канаде в 1872 г. была связана с одним и тем же высокопатогенным штаммом ВГА птиц, иллюстрируя один из наиболее ранних примеров поражения различных резервуаров вирусом гриппа птиц (Morens and Taubenberger, 2010).

Азиатская линия высокопатогенных вирусов гриппа H5Nx, о которой впервые была обнаружена у домашних гусей на юге Китая в 1996 г., продолжает циркулировать и распространяться в 2024–2025 гг. среди домашней птицы и диких птиц в Азии, Европе, на Ближнем Востоке, в Северной и Южной Америке, Африке и Антарктиде (Banyard et al., 2024; Peacock et al., 2025). Вспышки вируса высокопатогенного гриппа H5Nx субтипов привели к огромным экономическим потерям для птицеводческой отрасли, а их спорадическая передача от домашней птицы к человеку в нескольких странах подчеркивает их потенциальную угрозу общественному здравоохранению.

Начиная с 2020–2021 гг. новая серия вспышек высокопатогенных вирусов гриппа птиц клады 2.3.4.4b H5N1 и H5N8 поразила диких и домашних птиц в Евразии, Африке и Америке, вызвав их массовую гибель. В 2020 г. причиной большинства вспышек был вирус H5N8, но в октябре 2021 г. его постепенно заменил вирус H5N1 (Vi et al., 2024). Эпизодически сообщалось о межвидовых передачах высокопатогенного вируса гриппа птиц H5Nx от домашних птиц к людям. (Vi et al., 2024). Весной 2024 г. в Соединенных Штатах Америки были зарегистрированы случаи передачи вируса H5N1 от диких птиц к крупному рогатому скоту, циркуляция среди скота и случаи передачи человеку, с одним подтвержденным летальным случаем (CDC, 2025). Эти широкомасштабные вспышки вируса гриппа животных серьезно повлияли на популяции диких и домашних птиц и вызвали обеспокоенность общественности по поводу вируса гриппа животных с зоонозным и/или пандемическим потенциалом. В 2022–2023 гг. новые варианты субтипа H3N8 стали причиной первых спорадических случаев заражения людей этой линией в Китае (Vi et al., 2024; Yang et al., 2022).

Существует ряд проблем и ограничений при исследованиях ВГА. Сложность экологии ВГА, разнообразие видов-хозяев и изменчивая природа вируса создают трудности в исследованиях. Проблемные области в исследованиях вируса гриппа у диких птиц, наиболее актуальные на сегодняшний момент, включают:

- 1). Разнообразие и широкий спектр видов-хозяев;
- 2). Географическое распределение вирусов (субтипов, генотипов, сегментов) и распространение в новые регионы мира;
- 3). Высокую скорость эволюции, эволюцию вирулентных штаммов;
- 4). Роль перелетных птиц в распространении вируса;
- 5). Взаимодействие с домашними птицами;
- 6). Взаимодействие хозяина с патогеном и влияние на приспособленность;
- 7). Возникновение панзоотий.

Очевидно, что большая часть проблемных аспектов так или иначе связана с высокопатогенными вариантами вируса гриппа птиц, его зоонозным и пандемическим потенциалом. Высокопатогенные вирусы гриппа птиц представляют всемирную угрозу сельскохозяйственному сектору, общественному здравоохранению и некоторым популяциям диких птиц. Особую озабоченность вызывают финансовые последствия эпизоотий гриппа для отечественного птицеводства, связанные с прямыми потерями, отбраковкой и мерами реагирования, а также торговыми ограничениями. Могут существовать риски для здоровья, связанные с воздействием и последующим распространением ВГА от домашней птицы к человеку при непосредственном контакте с инфицированными птицами и зараженной вирусом окружающей средой. Наконец, ВГА может представлять опасность для некоторых восприимчивых популяций диких животных, когда высокопатогенные вирусы проникают с птицефабрик.

Таким образом, эволюция ВГА у диких птиц представляет собой сложное взаимодействие генетического разнообразия, механизмов передачи в окружающей среде, взаимодействия с хозяевами и экологических факторов, которые способствуют динамичному характеру эволюции вируса гриппа в этих природных резервуарах.

Степень разработанности темы

Систематическое изучение экологии ВГА началось после первых публикаций конца 1960-х годов, посвященных общей природе вирусов гриппа человека и животных, включая птиц (Pereira et al., 1967). Первый обзор по экологии вируса и ее связях с популяциями диких птиц датируется 1972 г. (Easterday and Tumova, 1972). В этом же году опубликованы первые сообщения об обнаружении вирусов гриппа в популяциях диких и домашних птиц на территории СССР (Slepuskin et al., 1972; Zakstel'skaja et al., 1972).

С этого времени начались самые активные исследования в мире под руководством зарубежных исследователей Вебстера, Киды (Kida et al., 1994; Webster et al., 1992). В Советском Союзе подобные активные работы возглавил академик Дмитрий Константинович Львов. Именно им суммированы результаты исследований по экологии и эволюции ВГА, проводимые Центром по экологии вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН в течение более чем 40 лет. Установлен генный пул ВГА, циркулирующих на территории России (L'vov et al., 2004). В частности, описаны новые антигенные формулы, в то время еще без наличия доступных последовательностей генома. В 1990-е годы началось активное секвенирование сегментов генома, главным образом фрагментарное. Впервые было показано, что вирусы гриппа, сохраняющиеся у уток, гнездящихся в Сибири, вносят свой вклад в весь евразийский генофонд вирусов гриппа, а также в появление вируса H5N1 в Гонконге. Предложена гипотеза циркуляции генов в Азии и подчеркнута целесообразность интенсивного эпиднадзора за водоплавающими птицами, особенно в Сибири, для получения информации о будущих пандемических штаммах вируса гриппа и для подготовки вакцин (Okazaki et al., 2000). Работы коллектива Института вирусологии им. Ивановского суммированы в ряде обзорных работ (L'vov, 2011; L'vov et al., 2004; Lvov et al., 2010a). Многочисленные коллективы проводят активные исследования в XXI веке, чьи результаты подробно рассмотрены в обзоре литературы.

Несмотря на значительную изученность вируса гриппа в целом, анализ степени разработанности темы экологии и генетического разнообразия вируса гриппа птиц в Северной Азии выявил ограничения и недостатки, которые могут повлиять на общую концепцию экологических и эволюционных особенностей вируса гриппа у диких птиц, на интерпретацию получаемых результатов и достоверность выводов на основе их анализа.

- 1). Пробелы в эпиднадзоре и мониторинге ((Martelli et al., 2023; Yang et al., 2024).
- 2). Географическая избирательность, различная представленность открытых данных по разным географическим регионам мира (Klaassen and Wille, 2023).
- 3). Проблемы в прогнозировании распространения вируса (Yang et al., 2024).
- 4). Не до конца изученные механизмы и факторы, приводящие к реассортации ВГА (Xie et al., 2023).

Наряду со значительными достижениями основных перечисленных работ по изучению экологии и эволюции вируса гриппа именно в азиатской части России, анализ выявил ряд следующих пробелов:

1 Отсутствие детального анализа экологических особенностей на основе больших выборок индивидуумов, а именно ассоциированности вируса с крупными таксонами и видами хозяев, географическими территориями, сезонами.

2 Отсутствие анализа распространенности и ассоциированности субтипов и комбинаций HA и NA с таксонами хозяев, географическими территориями, сезонами.

3 Отсутствие полных геномов для всех LPAI (низкопатогенный грипп птиц) на территории азиатской части России на фоне значительной представленности доступных последовательностей полных геномов H5Nx HPAI (высокопатогенный грипп птиц).

4 И в результате: отсутствие детального сравнительного филогенетического и филогеографического анализа сегментов генома для всего известного генофонда вирусов гриппа птиц в азиатской части России на основе современной базы данных.

Эти четыре проблемы являются ключевыми для всех дальнейших более детальных фундаментальных и прикладных исследований, таких как: выявление случаев заноса вируса гриппа на территорию, прогноз и раннее обнаружение эпизоотий у диких и домашних птиц, изучение дальнейших путей и механизмов распространения ВГА, изучение ключевых факторов межвидовой передачи и зоонозного потенциала, генетические маркеры фенотипа вируса и др. Вышеперечисленный анализ актуальности, степени разработанности и проблемных аспектов исследований экологии, эволюции и генетического разнообразия вируса гриппа птиц определил основную цель и задачи настоящего диссертационного исследования.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является изучение генетического и фенотипического разнообразия, экологических и эволюционных особенностей циркуляции вируса гриппа А в популяциях диких птиц азиатской части России (Северной Азии).

Для достижения поставленной цели решались следующие основные задачи:

1. Провести сбор образцов биологического материала от диких птиц на территории Северной Азии и осуществить диагностику, выделение, субтипирование, генотипирование и полногеномное секвенирование вируса гриппа А; изучить вирусологические свойства и сформировать коллекцию штаммов.
2. Исследовать распространенность и экологические аспекты циркуляции вируса гриппа А у диких птиц в Азиатской части России (2007–2020 гг.), провести анализ ассоциированности поверхностных белков вируса гриппа отдельных субтипов с видом хозяина, географическим регионом, сезоном года для территории Северной Азии.
3. Описать генетическое разнообразие вируса гриппа птиц в Азиатской части России в период 2007–2020 гг., филогенетические связи современных вариантов и установить события реассортации генома.
4. Исследовать биологические характеристики ряда отдельных штаммов LPAI субтипов в популяциях диких птиц Азиатской части России.
5. Организовать и провести мониторинг высокопатогенного вируса гриппа H5Nx у диких птиц и установить его генетическое разнообразие и эволюционные тренды.
6. Разработать практические рекомендации по внедрению полученных научных данных о вирусе гриппа птиц в системы мониторинга, профилактики и контроля заболеваний.

Научная новизна работы

В ходе данной работы получены уникальные данные о циркуляции вирусов гриппа А среди диких птиц на территории Северной Азии в период с 2007 по 2020 гг. Впервые установлена распространенность ВГА и ее достоверные различия у разнообразных таксонов диких птиц на основании выборки 34835 особей 269 видов, собранных на территории Северной Азии, принадлежащих к 48 семействам 20 отрядов.

Впервые проанализирована ассоциированность поверхностных белков вируса гриппа HA и NA отдельных субтипов с видом хозяина, географическим регионом, сезоном года для территории Северной Азии и предложена концепция географической гетерогенности распространения вируса гриппа.

Впервые показана достоверная ассоциированность субтипа H6N6 с территорией Дальнего Востока, предложена гипотеза совместной циркуляции этого субтипа в популяциях диких и домашних птиц Восточного Китая.

Впервые достоверно установлена одновременная циркуляция 44 различных субтипов вируса гриппа в популяциях диких птиц Сибири и Дальнего Востока, среди которых достоверно ассоциированными между собой являлись следующие 12 комбинаций (субтипов) HA и NA: H1N1, H3N8, H4N6, H5N3, H8N4, H9N2, H10N7, H11N9, H12N5, H14N9, H15N4, H16N3, предполагая устойчивый фенотип вируса в природе. Впервые обнаружена достоверная моноассоциированность с одним субтипом нейраминидазы NA следующих субтипов гемагглютинина HA: H1(N1), H3(N8), H4(N6), H8(N4), H12(N5), H15(N4) и H16(N3). Напротив, отсутствие ассоциированности с одной нейраминидазой и наибольшее разнообразие комбинаций установлено для субтипов H2Nx, H5Nx, H6Nx, H7Nx, H10Nx.

Впервые сформирована концепция филогенетических паттернов всех восьми сегментов генома вируса гриппа, выделенных нами от диких и домашних птиц в период 2007–2020 гг. на территории Северной Азии с использованием панорамного филогенетического анализа установленных нами 267 нуклеотидных последовательностей полных геномов. Впервые обнаружены и описаны географически специфичные (Дальневосточная, Восточно-Сибирская/Якутская, Западно-Сибирская/Центральноазиатская, Западно-Сибирская/Европейская), субтип-специфичные клады (H5N1, H5N8, H6N6, H9N2) и видоспецифичные клады (Gull-like, Classical Avian-like). Установлена принадлежность вирусов из субтип-специфичных клад H5N1, H5N8, H6N6, H9N2 исключительно к аллелю А по сегменту NS сегмента, в то время как вирусы из всех географически специфичных клад принадлежали обоим аллелям А и В.

Впервые доказан значимый вклад низкопатогенных вирусов различных субтипов и высокопатогенных вирусов H5Nx, циркулирующих в Сибири в поток генов и события реассортации в Восточно-Азиатском регионе. Выявлено пять реассортантов высокопатогенного вируса гриппа H5N6, наиболее вероятно распространившегося в Японию из азиатской части России в 2016–2017 гг. и содержащего сегменты, циркулирующие в Сибири. Впервые показано, что высокопатогенные вирусы H5N6 клады 2.3.4.4, циркулировавшие в Японии в 2016–2017 гг., возникли в результате реассортации с совместно циркулирующими высокопатогенными китайскими и низкопатогенными евразийскими вариантами вируса диких птиц и принадлежат к пяти реассортантным генотипам, наиболее вероятно распространившимся в Японию из азиатской части России и Северного Китая.

Впервые выявлены и описаны многочисленные случаи реассортации генома дальневосточных вариантов вируса гриппа 2017–2020 гг., принадлежащих Евразийской генетической линии, с вариантами вируса Северо-Американской генетической линии, циркулировавшими в Канаде и США; выявлен случай двойной реассортации у вируса H6N2 субтипа.

Впервые показано, что среди диких перелетных птиц на Дальнем Востоке России одновременно ко-циркулируют две различные генетические и антигенные группы вируса гриппа H6Nx субтипов. Первая представлена вирусами H6N1, H6N2, H6N3 субтипов, содержащими все сегменты генома классической Евразийской филогенетической линии вирусов диких птиц, а вторая группа содержит штаммы H6N6 субтипа, все сегменты генома которых полностью идентичны генетическим вариантам вируса, эндемично циркулирующим в популяциях домашних птиц на территории Китая (Chinese poultry-like). Показана одновременная активная ко-циркуляция и реассортация вирусов H6Nx имеющих сегменты различного происхождения, в популяциях диких птиц Дальнего Востока России.

Впервые в России обнаружен вирус гриппа редких субтипов H12N5, H12N2, H14N3, впервые в мире обнаружен субтип H14N9. Впервые показано, что дивергенция евразийской H14.2.1 и американской H14.2.2 линий вируса произошла около 2003 г. (95 % HPD; 2002–2005 гг.) и предложена гипотеза о формировании генетического разнообразия вируса H14Nx в Евразии.

Впервые установлено, что на территории России во время беспрецедентной эпизоотии гриппа птиц 2016–2017 гг. циркулировали четыре из семи основных известных реассортантов вируса гриппа H5N8, а именно SABAD8AA, CAEAF8AA, AAAAA8AA и AADAA8AA.

Впервые создана панель из 12 штаммов H1N1, H2N2, H5N1, H8N4, H10N5, H13N8, H15N4, H16N3 субтипов, которая апробирована и рекомендована для создания штаммов-продуцентов для диагностики и дальнейших прикладных исследований.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость данной работы заключается в том, что получены новые данные об экологических особенностях циркуляции, разнообразии и количестве субтипов, паттернах распределения исследованного вируса гриппа по филогенетическим группам в зависимости от анализируемого сегмента генома. Выявлены случаи реассортации (в том числе межконтинентальной) и распространения среди домашних и диких птиц, которые указывают на существование активного центра биоразнообразия вируса гриппа в гнездовом ареале диких водоплавающих птиц Северной Азии. Подобная информация, детализированная в разделе о новизне результатов, существенно дополняет знания по экологии и эволюции ВГА на территории не только Евразии, но и других континентов. Данные о биологическом разнообразии выделенных штаммов вируса гриппа от диких птиц могут быть использованы в изучении экологии патогена, эволюции, а также путей распространения вируса.

Настоящая работа обладает большой практической значимостью, и заключается в том, что проведенные прикладные исследования вируса гриппа птиц позволили разработать практические предложения по применению полученных научных результатов. Была оптимизирована работа по мониторингу вируса гриппа птиц, а именно: сформированы методические рекомендации, лабораторный регламент, предложена оптимизация секвенирования и дифференциальной ПЦР-диагностики. На основании результатов многолетнего мониторинга на территории Северной Азии была сформирована и зарегистрирована база данных по экологии и распространенности вирусов гриппа у диких птиц «Распространенность вирусов гриппа А и авулавирозов у диких птиц в азиатской части России». (Свидетельство о гос. регистрации № 2022620256 от 17 января 2023 г.). Создана коллекция штаммов различных субтипов, из которых 123 штамма приняты на патентное депонирование в следующие государственные коллекции вирусов Российской Федерации:

1. Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.
2. Коллекция вирусов гриппа и ОРЗ, отдел этиологии и эпидемиологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморodinцева» Минздрава России.
3. Государственная коллекция вирусов II–IV групп патогенности, Отдел Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И.Ивановского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

В международные базы данных задепонированы нуклеотидные последовательности 2318 сегментов генома вируса гриппа птиц. Созданная панель из 12 штаммов H1N1, H2N2, H5N1, H8N4, H10N5, H13N8, H15N4, H16N3 субтипов апробирована и рекомендована для создания штаммов-продуцентов для диагностики и дальнейших прикладных исследований. Штаммы вирусов гриппа, полученные в ходе данной работы, могут быть использованы в диагностических целях в качестве антигенов и полученных на их основе поликлональных сывороток.

Результаты работы защищены 15 патентами РФ.

Методология и методы исследования

Достижение поставленной цели осуществлялось путем комплексного подхода к решению задач с использованием набора классических и новых современных методов исследования на основе большой репрезентативной выборки биологического материала. Результаты были получены при помощи вирусологических (культивирование вирусов *in vitro* и *in vivo*, титрование по ЦПД, культивирование и титрование в системе развивающихся куриных эмбрионов), молекулярно-биологических (выделение нуклеиновых кислот, обратная транскрипция, ПЦР, полногеномное секвенирование методом Сэнгера, NGS-секвенирование) и методов биоинформатического анализа (сборка и анализ полногеномных последовательностей, филогенетический и эволюционный анализ).

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.

Положения, выносимые на защиту

1. На территории Северной Азии (азиатской части России) существует активный центр формирования биоразнообразия вируса гриппа А в гнездовом ареале диких водоплавающих птиц, о чем свидетельствуют экологические особенности циркуляции, разнообразие и количество субтипов, паттерны распределения исследованного вируса гриппа по филогенетическим группам в зависимости от анализируемого сегмента генома, а также выявление случаев реассортации, в том числе между линиями, стабильно циркулирующими на разных континентах.
2. Существуют достоверные различия в распространенности вируса гриппа среди различных таксонов диких птиц, что подтверждено исследованиями репрезентативной выборки биологических образцов от 34835 особей диких птиц 269 видов, собранных на территории Северной Азии, принадлежащих к 48 семействам 20 отрядов.
3. Существует различная ассоциированность поверхностных белков вируса гриппа HA и NA отдельных субтипов с видом хозяина, географическим регионом, сезоном года для территории Северной Азии.
4. Из 44 обнаруженных субтипов ВГА, наиболее часто встречающимися у диких птиц Северной Азии, являются субтипы: H1N1, H3N8, H4N6, H5N3, H8N4, H9N2, H10N7, H11N9, H12N5, H14N9, H15N4, H16N3, для которых достоверно установлена ассоциированность HA и NA, что предполагает устойчивый фенотип вируса в природе. При этом наибольшее разнообразие комбинаций установлено для субтипов H2Nx, H5Nx, H6Nx, H7Nx, H10Nx.
5. У вируса гриппа птиц Северной Азии существуют следующие отдельные филогенетические группы: географически специфичные клады (Дальневосточная, Восточно-Сибирская/Якутская, Западно-Сибирская/Центральноазиатская, Западно-Сибирская/Европейская), субтип-специфичные клады (H5N1, H5N8, H6N6, H9N2) и видоспецифичные клады (Gull-like, Classical Avian-like).
6. Существует значимый вклад низкопатогенных вирусов различных субтипов и высокопатогенных вирусов H5Nx, циркулирующих в Сибири в поток генов и события реассортации в Восточно-Азиатском регионе.
7. На азиатской территории России в период 2007–2020 гг. циркулировали высокопатогенные H5Nx вирусы гриппа различного происхождения. Они были отнесены к различным, впервые выявленным на территории России кладам, генотипам, а также демонстрировали события реассортации.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов работы и выводов определяется использованием комплекса методов, адекватных целям и задачам исследования, а также методов статистической обработки полученных результатов.

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих 45 международных конференциях: второй международной встрече по гриппу «2nd International Influenza Meeting» (Германия, Мюнстер, 2010), международной конференции «Гусеобразные Северной Евразии: география, динамика и управление популяциями» (Элиста, 2011), XIII международном симпозиуме по респираторным вирусным инфекциям «International Symposium on Respiratory Viral Infections» (Рим, Италия, 2011), международной конференции «Russian-German Conference «Molecular Basis of Infections»» (Новосибирск, 2011), Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions" (Гонконг, Китай, 2011), 5th Annual Centers of Excellence for Influenza Research and Surveillance meeting (США, Атланта, 2011), четвертой Оксфордской международной конференции по гриппу «4th Oxford International Influenza Conference «Influenza2011: Zoonotic Influenza and Human Health»» (Великобритания, Оксфорд, 2011), третьем международном семинаре «The 3th Young Researcher Seminar for Zoonosis Control» (Япония, Саппоро, 2011), четвёртой конференции Европейской научной рабочей группы по гриппу «4th ESWI conference» (Мальта, Сент-Джулиан, 2011), второй международной конференции «Астана-Биотех 2011» (Казахстан, Астана, 2011), международной научно-практической конференции «Инфекционная патология животных» (Омск, 2011), четырнадцатом международном симпозиуме по респираторным вирусным инфекциям «XIV International Symposium on Respiratory Viral Infections» (Турция, Стамбул, 2012), шестой ежегодной встрече «6th Annual CEIRS Network Meeting» (США, Нью-Йорк, 2012), Оксфордской конференции по гриппу «Influenza 2012: One Influenza, One world» (Великобритания, Оксфорд, 2012), седьмой ежегодной встрече «7th Annual CEIRS Surveillance meeting» (США, Мемфис, 2013), международной конференции, посвящённой проблемам гриппа «Options for the Control of Influenza VIII» (Южная Африка, Кейптаун, 2013), тридцать седьмой встрече общества водоплавающих птиц «37th Annual Meeting of the Waterbird Society» (Германия, Вильгельмсхафен, 2013), The First China-Russia Conference on Wild Bird Migration and Avian Influenza Virus Transmission (Китай, Пекин, 2014), 12th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (Таиланд Бангкоке, 2014), 4th International Influenza Meeting (Германия, Мюнстер, 2014), 5th International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, IMED (Австрия, Вена, 2014), 16th Meeting of the Goose Specialist Group (Китай, Пекин, 2014), Russian-Chinese Workshop «Avian Flu and Public Concerns - 2014» (Китай, Синин, 2014), международной научно-практической конференции «Ареалы, миграции и другие перемещения диких животных» (Владивосток, 2014), 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Дания, Копенгаген, 2015), 13th China Ornithological Conference (Китай, Хэфэй, 2015), IV всероссийской конференции молодых ученых с международным участием (Улан-Удэ, 2016), III научно-практической молодежной конференции «Экобиологические проблемы Азово-Черноморского региона и комплексное управление биологическими ресурсами» (Севастополь, 2016), Annual meeting of the American Association of Avian Pathologists (AAAP) (with the American Veterinary Medical Association (AVMA) Annual Meeting) (США, Индианаполис, 2017), International conference «Transmission of respiratory viruses: from basic science to evidence based options for control» (Китай, Гонконг, 2017), International conference «Trends in Influenza Research» (Санкт-Петербург, 2017), XIX международной научной конференции с элементами научной школы молодых ученых «Биологическое разнообразие Кавказа и юга России» (Махачкала, 2017), 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), международной

конференции «Global Alliance for Research on Avian Diseases 2018, International Conference» (Вьетнам, Ханой, 2018), Central Asian Symposium on Emerging Infectious diseases (EIDs) (Китай, Пекин, 2018), первом всероссийском орнитологическом конгрессе (Тверь, 2018), NIES_NIER_USGS International workshop 2019 (Япония, Цукуба, Ибараки, 2019), International Seminar for AI Surveillance in Wild Birds (Южная Корея, Сеул, 2019), международной конференции «Trends in Influenza Research» (Санкт-Петербург, 2020), международной встрече «II International Workshop «The impact of climate change on the spreading of new viral infections during birds seasonal migrations in Northern and Eastern Eurasia»» (Новосибирск, 2020), XXIII международной научной конференции с элементами школы для молодых ученых «Влияние изменения климата на биологическое разнообразие и распространение вирусных инфекций в Евразии» (Махачкала, 2021), III International Workshop «The impact of climate change on the spreading of new viral infections during birds' seasonal migrations in Northern and Eastern Eurasia» (Новосибирск, 2021), IV International Workshop «The impact of climate change on the spreading of new viral infections during birds' seasonal migrations in Northern and Eastern Eurasia» (Новосибирск, 2022), IX международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков OpenBio (Новосибирск, р.п. Кольцово, 2022), III международном форуме «Дни вирусологии» (Санкт-Петербург, 2022), 20th Meeting of the IUCN SSC Goose Specialist Group (Монголия, Улан – Батор, 2023), втором всероссийском орнитологическом конгрессе (Санкт-Петербург, 2023), II конференции «Геномика, метагеномика и молекулярная биология микроорганизмов» (Москва, 2023), XVI международной орнитологической конференции «Птицы Северной Евразии» (Казань, 2025), международной научно-практической конференции «Генетика и физиология: прошлое, настоящее, будущее» (Казахстан, Алматы, 2025).

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА В ДИССЕРТАЦИОННУЮ РАБОТУ.

Большая часть основных результатов исследований, представленные в диссертации, получены лично автором, с участием многочисленных отечественных и зарубежных коллективов. Постановка задач, планирование экспериментов, обработка результатов, представленных в диссертационной работе, написание основополагающих научных статей, анализ и интерпретация результатов для формирования выводов автором осуществлялись автором лично. Сбор биологического материала осуществлялся с участием Е.В. Шемякина, В.Ю. Габышева, М.В. Владимирцевой, И.М. Тиунова, П.С. Ктиторова, А.И. Мацыны, Ю.Н. Герасимова, Л.Д. Базарова, Е.Н. Бадмаевой, М.А. Андрияша, А.Г. Мархаева, О.Р. Друзяки, А.В. Друзяки, Ю.А. Щербакова, Ю.Н. Ирзы, А.В. Варкентина, В.Ю. Марченко, А.В. Прокудина, С.В. Леонова. Выделение изолятов вируса гриппа из первичного материала и изучение их биологических свойств проведено при участии И.П. Горкуновой, В.А. Бардиной, А.В. Епанчинцевой, Т.А. Килиной, Т.А. Мурашкиной, А.А. Дёрко, Н.А. Дубовицкого, В.Ю. Марченко, О.Г. Курской, А.Г. Дурьманова, А.В. Зайковской, М.В. Соломатиной. Диагностика, секвенирование и молекулярно-биологический анализ осуществлялись при участии М.В. Сивай, И.М. Суслопарова, В.А. Тернового, А.А. Дёрко, Н.А. Дубовицкого, И.А. Соболева. Обработка и анализ метаданных осуществлялись при участии Н.А. Дубовицкого, А.А. Дёрко, О.Г. Курской. Определение полных нуклеотидных последовательностей геномов штаммов вируса гриппа с помощью технологии секвенирования следующего поколения (NGS) на платформе Illumina выполнено на базе ЦКП «Геномика» совместно с к.б.н. М.Р. Кабиловым. Биоинформационный анализ результатов секвенирования и последующий филогенетический анализ полученных данных выполнены автором при участии Н.А. Дубовицкого, Н.С. Касьянова и И.А. Соболева. Анализ представленности вирусов, анализ ассоциированности субтипов, формирование таблицы сопряженности, оценка статистической значимости общей ассоциации, визуализация вклада отдельных категорий, расчёт отношения шансов, построение карт на основе GIS осуществлялось совместно с Н.А. Дубовицким.

ПУБЛИКАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ ИССЛЕДОВАНИЯ

По материалам диссертации опубликовано 138 печатных работ, в том числе 52 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, одна коллективная монография и 15 патентов РФ.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ. Диссертация изложена на 435 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 612 источников, в т.ч. 14 отечественных и 598 зарубежных авторов. Работа содержит 65 таблиц, 102 рисунка.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Настоящее исследование было проведено в рамках следующих программ и проектов: государственное задание ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (2005-2013); государственное задание ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (2013-2024); проект РНФ 20-44-07001 «Распространение РНК-вирусов птиц в Северной Азии и Азиатско-Тихоокеанском регионе: генетическое разнообразие, патогенный потенциал и прогнозирование влияния на птицеводство»; проект РНФ 17-44-07001 «Прогнозирование распространения птичьего гриппа в России и Японии для предупреждения и контроля: роль Восточноазиатского-Австралийского пролетного пути в перемещении генов и реассортации вируса гриппа»; проект РФФИ 16-34-00306 «Реассортантные вирусы гриппа Центральной Азии: структурно-функциональные особенности и эволюционная динамика консервативных сегментов»; проект РФФИ 17-04-01919_A «Особенности формирования гетерологичного генного пула РНК-содержащих орто- и парамиксовирусов у водных млекопитающих Каспийского моря»; проект РФФИ № 13-04-91179-ГФЕН_a «Влияние экологических характеристик диких птиц в структуре распространения вирусов гриппа H5N1 и других субтипов в природных экосистемах»; проект ФЦП «Филогеография синантропных птиц и оценки их роли в распространении вирусных инфекций, опасных для человека и животных на территории Центральной Азии (Россия, Китай)»; проект ФЦП № 14.613.21.0045 «Разработка системы оценки риска появления вирусов, опасных для человека и животных на территории Центральной Азии (Россия, Китай) для оптимизации современных методов диагностики, профилактики и лечения».

Исследование было одобрено Комитетом по биомедицинской этике Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск (протоколы № 2013-23 и 2021-10). В исследовании использовались условия уровня биобезопасности по работе с патогенными агентами по лицензии Роспотребнадзора. Лабораторные исследования были проведены в соответствии с методами, рекомендованными Всемирной Организацией Здравоохранения (WHO) и Всемирной организацией здоровья животных (WOAH). Все оборудование, использованное в работе, прошло метрологическую проверку в соответствии с действующими правилами и нормативными документами.

2.1 Распространенность и экологические аспекты циркуляции вируса гриппа А у диких птиц в Азиатской части России (2007–2020 гг.)

В данном разделе работы было проведено исследование таксономического и экологического разнообразия видов-хозяев диких птиц, сравнения процента выявления вируса в зависимости от видовой принадлежности, географического региона и времени (сезона, года). Оценена ассоциированность отдельных субтипов поверхностных (субтипизирующих) белков вирусов с видами хозяев, регионами выявления и временем года. Также проанализировано территориальное распространение вируса гриппа и выявлены ключевые территории наблюдения за вирусом у диких птиц.

В период с 2007 по 2020 гг. на азиатской территории России был проведен сбор биологического материала от диких птиц в 17 субъектах Российской Федерации. Для

комплексного анализа всех вариантов вируса материал был собран также от домашних птиц при выявлении эпизоотий гриппоподобных инфекций.

Для сравнительных исследований нами были условно обозначены следующие географические территории азиатской России, на которых располагались места сбора материала: Прикаспийский регион (1), Западная Сибирь (2), Центральная Азия (3), Центральная Сибирь (4), Восточная Сибирь (5), Дальний Восток (6) (рисунок 1).



Рисунок 1 – Регионы РФ, где проведен сбор биологического материала, объединенные в 5 основных географических территорий для сравнительного анализа: Прикаспийский регион (1), Западная Сибирь (2), Центральная Азия (3), Центральная Сибирь (4), Восточная Сибирь (5), Дальний Восток (6).

Для визуализации активности сбора материала построена карта конкретных точек сбора материала (рисунок 2) и плотности сбора на основе координат GPS. Далее в работе использованы эти условные географические определения, которые также применялись для описания филогенетической топологии сегментов выделенных штаммов.



Рисунок 2 – Карта точек сбора биологического материала от диких птиц, использованного в работе, построенная на основе координат GPS.

Характеристики выборки диких птиц и соотношения выделенных вирусов гриппа в зависимости от видовой принадлежности, региона и года обработаны в приложении Excel. Полный массив информации был оформлен в виде базы данных. Были определены два сезона для сбора материала. Образцы от 10424 особей были собраны в весенне-летний сезон,

включающий весеннюю миграцию и гнездовой период (март–июль). Образцы от 24297 особей диких птиц были собраны в осенне-зимний сезон, включающий период линьки, осеннюю миграцию, период зимовки (август–февраль). Вовлеченным в циркуляцию вируса гриппа считали такой вид, по крайней мере у одной особи которого был выявлен вирус гриппа (далее – «вовлеченные виды птиц»).

Всего был собран биологический материал от 34835 особей 269 видов, принадлежащих 48 семействам 20 отрядов. От вовлеченных видов птиц собрано 20648 образцов. Вовлеченные виды птиц относятся к следующим отрядам: гусеобразные, поганкообразные, ржанкообразные, журавлеобразные, олушеобразные, голубеобразные, аистообразные. Самый распространенный отряд среди выборки – гусеобразные. Отряд гусеобразные представлен в основном двумя трибами семейства утиных: речными утками (*Anatini*, 10 видов) и нырковыми утками (*Aythiini*, 4 вида). Среди речных уток наибольшее количество образцов получено от чирка-свистунка (n=2605) и кряквы обыкновенной (n=2435). Далее третье и четвертое место занимают серая утка (n=1264) и чирок-трескунок (n=949). Нырковые утки наиболее широко представлены видом красноголовый нырок (n=1849) и, далее хохлатая чернеть (n=620) и морская чернеть (n=343) и красноносый нырок (n=94).

Всего в результате работ из собранных 34835 образцов в системе РКЭ было выделено 837 изолятов гемагглютинирующих агентов, для 549 из которых определена принадлежность к ВГА. Примечательно, что количество видов, вовлеченных в циркуляцию вируса гриппа, оказалось равным 29. Всего у этих видов, принадлежащих шести отрядам и восьми семействам, был собран материал от 20648 особей, что составляет более половины всей выборки. Далее проведен анализ выделения вируса гриппа от различных видов по годам и по географическим территориям за все время исследования. Из полученных таблиц сформирована база данных, которая применялась для выявления процента вируса в любой из выборок, формируемой на основе таксономической и/или экологической принадлежности птиц, периода выделения или географического места выявления. Получены данные об абсолютном количестве выявленных изолятов вируса гриппа и о проценте выявления относительно различных таксонов, географических территорий, сезонов и годов.

Общий процент выявления вируса гриппа у всей выборки птиц (n=34835) составил 1,58 %, а у птиц вовлеченных видов (n=20648) – 2,66 %.

Из 20 отрядов птиц у следующих 11 отрядов (включающих 32 семейства) вируса не было обнаружено:

1. Аистообразные *Ciconiiformes* – Аистовые (*Ciconiidae*);
2. Буревестникообразные *Procellariiformes* – Буревестниковые (*Procellariidae*)
Качурки (*Hydrobatidae*);
3. Воробьинообразные *Passeriformes* – 21 семейство;
4. Гагарообразные *Gaviiformes* – Гагары (*Gavia*);
5. Дятлообразные *Piciformes* – Дятловые (*Picidae*);
6. Птицы-носороги *Bucerotiformes* – Удодовые (*Upupidae*);
7. Ракшеобразные *Coraciiformes* – Зимородковые (*Alcedinidae*);
8. Собообразные *Strigiformes* – Совиные (*Strigidae*);
9. Соколообразные *Falconiformes* – Соколиные (*Falconidae*);
10. Стрижеобразные *Apodiformes* – Стрижиные (*Apodidae*);
11. Ястребообразные *Accipitriformes* – Ястребиные (*Accipitrida*).

На диаграмме выявления вируса для всех вовлеченных видов (рисунок 3) очевидна целесообразность рассмотрения только тех видов, для которых выборка является репрезентативной. Ряд видов не может быть достоверно сравним с другими группами. Однако, важен непосредственно факт обнаружения вируса гриппа у данных видов и, следовательно, вовлеченность в циркуляцию вируса – подтверждение статуса «вовлеченного вида». В связи с этим далее построена диаграмма, включающая только репрезентативно представленные вовлеченные виды, исследованные в осенний период (рисунок 4).

Представленность вируса гриппа по видам и сезонам

Виды с $n \geq 10$ и шириной ДИ ≤ 30 п.п. | * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ (FDR)

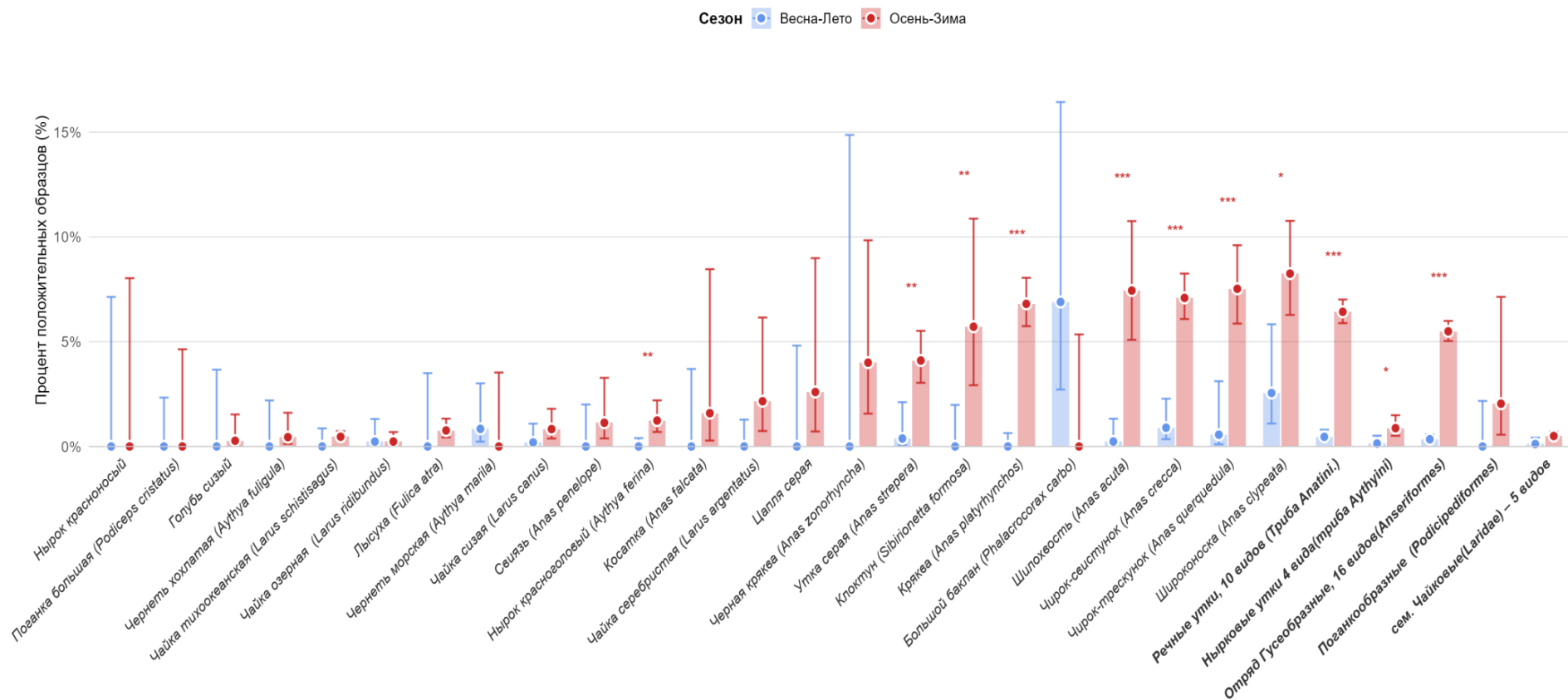


Рисунок 3 – Процент выявления вируса гриппа у всех вовлеченных видов. Синим цветом отмечены столбцы со значениями для весеннего сезона, красным – для осеннего сезона.

Представленность вируса гриппа в осенний период

95% ДИ Уилсона | Буквы — CLD по тестам Фишера с FDR ($q < 0.05$)

Трибы в сравнении не участвуют

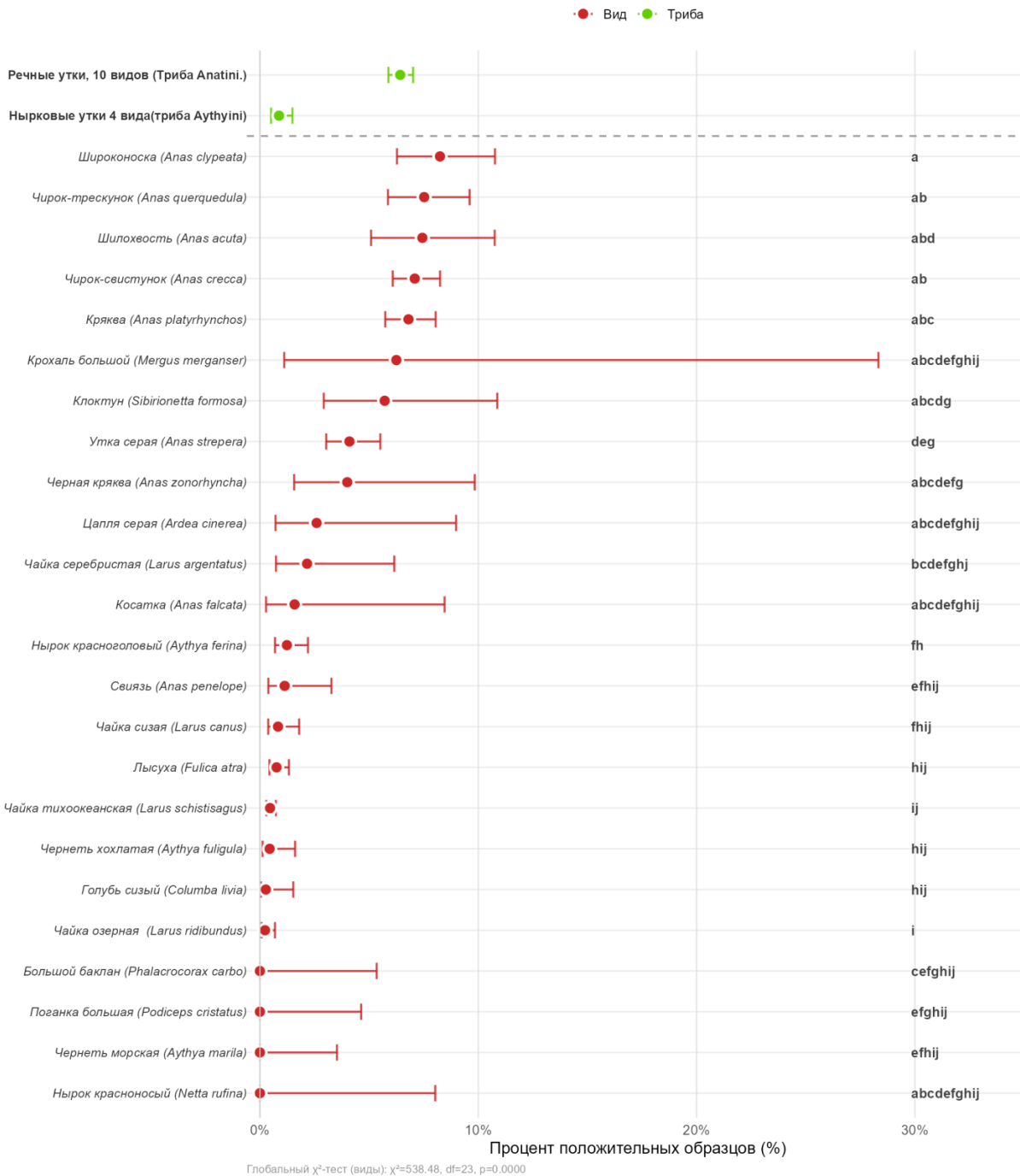


Рисунок 4 – Процент выявления вируса гриппа у всех вовлеченных видов в осенний период. Парные сравнения долей положительных образцов между всеми парами видов проводились с помощью точного двустороннего теста Фишера. Для контроля ложноположительных результатов применялась поправка на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга (FDR). По результатам парных сравнений виды были сгруппированы с помощью компактного буквенного отображения (Compact Letter Display, CLD): виды, между которыми отсутствуют достоверные различия ($q \geq 0.05$), обозначены одинаковыми буквами.

В диаграмме также указан процент выявления вирусов гриппа для таксонов рангом выше, чем вид – добавлены проценты выявления у основных отрядов, семейств и отдельно двух триб семейства утиные. Отдельно представлены значения, полученные в весенне-летние и осенне-зимние сезоны для каждого таксона. Показано, что процент выявления вируса гриппа в весенне-

летний сезон во всех случаях достоверно ниже, чем осенне-зимний, и достигает максимума у широконоски 2,55 % (ДИ95; 0,87-5,95).

2.2 Разнообразие субтипов вируса гриппа

Проведено субтипирование выявленных изолятов вируса гриппа (таблица 12). Из исследованных 549 изолятов полностью определить субтипы и подтвердить секвенированием удалось для 424. Для оставшихся 125 изолятов не удалось (или частично удалось) определить следующие комбинации: HxNy (n=82), HxN1 (n=2), HxN2 (n=2), HxN6 (n=1), HxN7 (n=2), HxN9 (n=8), H1Ny (n=1), H3Ny (n=13), H4Ny (n=10), H6Ny (n=4), где Hx обозначает неидентифицированный гемагглютинин, а Ny – неидентифицированную нейраминидазу.

Таблица 2 – Количество всех субтипов поверхностных белков HA, NA и их комбинаций у выделенных вирусов, изучаемых в 2007–2020 гг.

	Субтип нейраминидазы (NA)											Всего
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	Ny		
H1	24	1	1			1				1	29	
H2		3*	2								8	
H3	1	6	1			20		175		12	215	
H4	1	1				68				10	80	
H5	3	5	7					5			20	
H6	6	7	1			17		2		4	37	
H7	1		2				1				4	
H8				3							3	
H9		3									3	
H10			1		1	4	3				9	
H11								8	5		13	
H12		1			11						12	
H13		3				7		1			11	
H14			1						2		3	
H15				1							1	
H16			4								4	
Hx	2	2				1	2		8	82	97	
Всего	41	32	20	4	12	118	6	192	15	109	549	



Примечание: Hx, Ny – неидентифицированные субтипы поверхностных белков HA и NA; * – вирусы, выявленные в 2005 г.

Следует упомянуть, что начиная с 2016 г. субтипы определены для всех изолятов с помощью анализа полногеномных последовательностей, полученных NGS секвенированием. До 2015 г. основную массу изолятов субтипировали комбинацией методов ПЦР с наборами субтипировующих праймеров, РТГА с референс-панелью сывороток и антигенов, и секвенирования фрагментов генома. Такой подход имел множество ограничений и является менее эффективным для изменчивых поверхностных белков. Лишь для небольшого числа изолятов были секвенированы фрагменты генов HA и NA методом Сэнгера и субтип был дополнительно подтвержден сравнением нуклеотидной последовательности.

Диаграмма процентного соотношения субтипов среди всех 424 изолятов с подтвержденным субтипом приведена на рисунке 5. Более 50 % всех изолятов представлено двумя субтипами: H3N8 и H4N6.

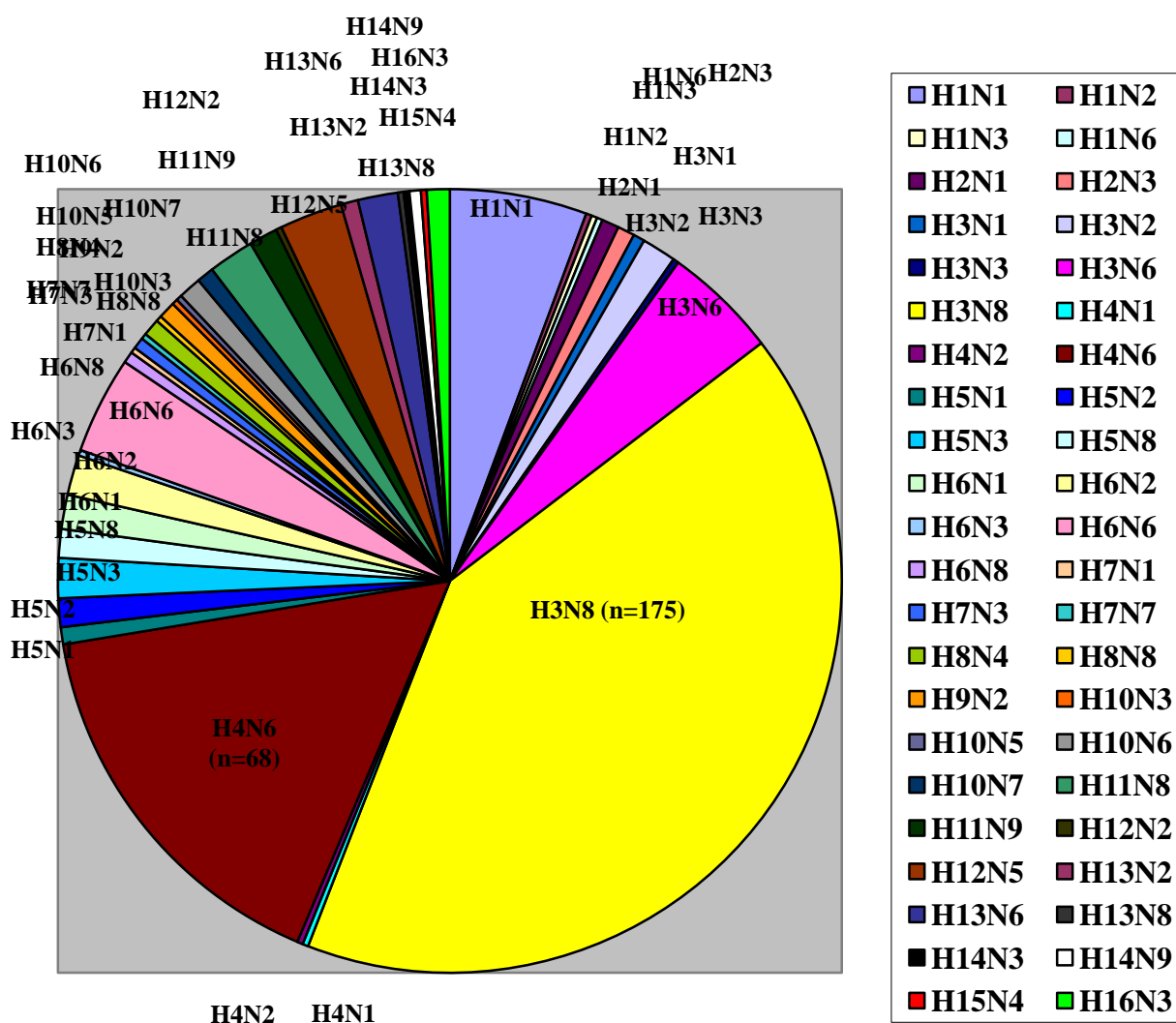


Рисунок 5 – Диаграмма процентного соотношения 44 различных субтипов вируса гриппа среди 424 изолятов с подтвержденным субтипом.

Отдельно стоит упомянуть образцы (n=4), в которых одновременно были идентифицированы разные вирусы. При этом была обнаружена РНК вирусов гриппа различных субтипов, а также РНК птичьего парамиксовируса АPMV-6. В дальнейшем этот факт был подтвержден секвенированием геномов в образцах.

2.3 Пространственно-временная ассоциированность субтипов вируса гриппа и ассоциированность с видами хозяев

Нами был проведен анализ ассоциированности разнообразия субтипов вируса гриппа с географическими территориями азиатской России и ассоциированности с видами хозяев.

На первом этапе необходимо было определить наиболее ассоциированные субтипы – комбинации HA и NA, которые предположительно и являются наиболее стабильными и распространенными комбинациями поверхностных гликопротеинов в исследованной выборке. Следует отметить, что в анализ взяты и изоляты, для которых субтипы определить не удалось, так как они вносят вклад в ассоциированность, вклад в каждую ячейку матрицы. В результате анализа (рисунок 6) достоверно ассоциированными субтипами среди исследованных 549 изолятов являются 12 субтипов со следующими комбинациями: H1N1, H3N8, H4N6, H5N3, H8N4, H9N2, H10N7, H11N9, H12N5, H14N9, H15N4, H16N3.

Меньшими значениями степени ассоциированности обладают следующие девять комбинаций: H2N2, H5N2, H6N2, H6N6, H7N3, H7N7, H13N2, H13N6, H14N3. Остальные комбинации с положительной ассоциированностью (синий цвет) имеют пограничное значение пирсоновских остатков и не рассматриваются нами как достоверно ассоциированные комбинации. Все комбинации с отрицательной ассоциированностью имеют красный оттенок на рисунке, и, вероятно, являются менее распространенными и стабильными в природе.

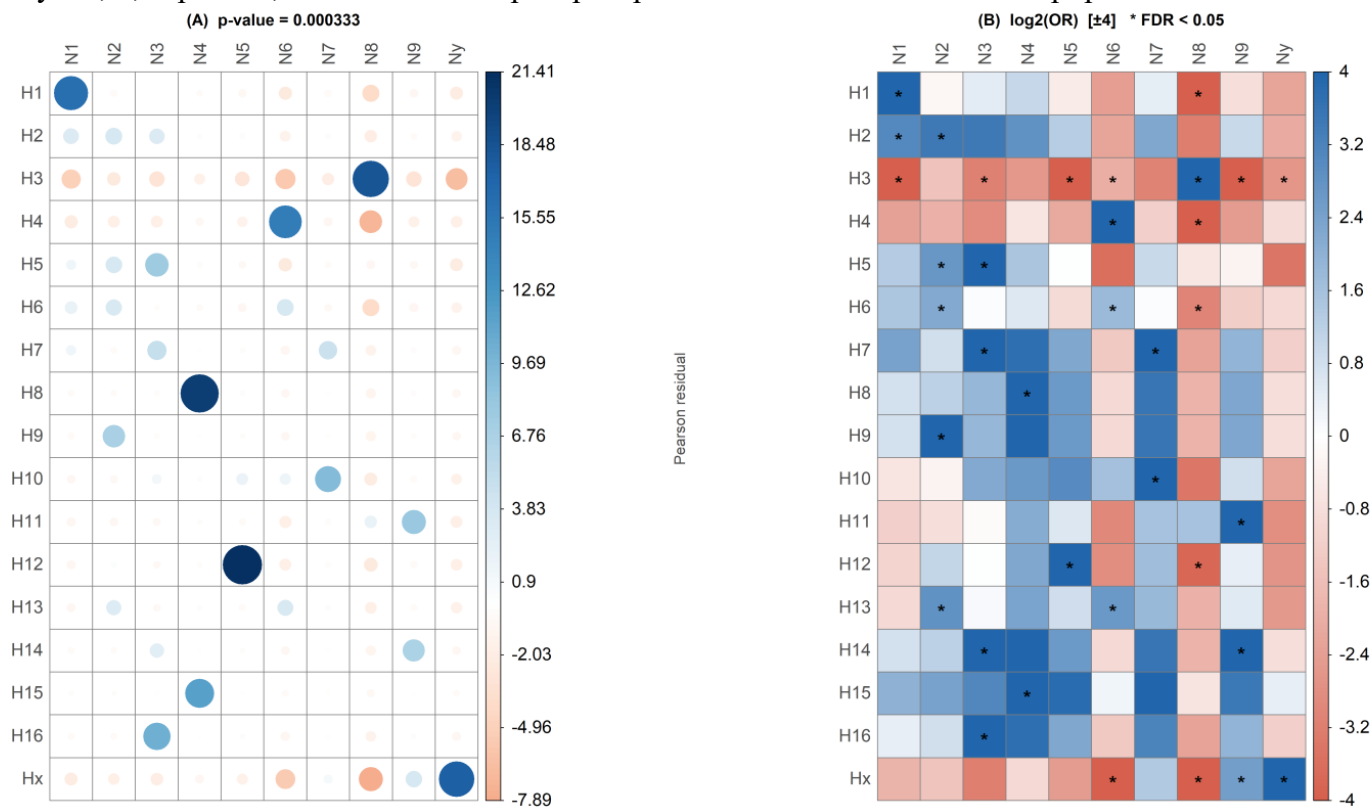


Рисунок 6 – Анализ ассоциаций субтипов HA и NA вируса гриппа А. (А) Стандартизированные остатки Пирсона по результатам теста хи-квадрат с симуляцией методом Монте-Карло (B = 3000). (В) Попарные отношения шансов (OR) для каждой комбинации субтипов HA-NA в логарифмической шкале (log2); рассчитаны с поправкой Холдейна (+0,5 ко всем ячейкам), шкала ограничена значениями ±4. Синий цвет соответствует комбинациям, встречающимся чаще ожидаемого (OR > 1), красный — реже (OR < 1).

Следует отметить, что в нашей выборке обнаружены субтипы HA с моноассоциированностью – со достоверной ассоциированностью только с одной NA. Это H1, H3, H4, H8, H12, H15 и H16, для которых ассоциированность подтверждена только с одним субтипом нейраминидазы. Напротив, отсутствие достоверной ассоциированности с нейраминидазой и наибольшее разнообразие ассоциированностей продемонстрировали субтипы H2, H5, H6, H7, H10

Таким образом, из 44 обнаруженных в нашей выборке комбинаций, 12 являются наиболее распространенными и стабильными, еще девять встречаются менее часто и обнаруживают меньшую ассоциированность.

Далее проведен анализ ассоциированности 44 обнаруженных комбинаций/субтипов с 21 видом диких птиц. Для анализа из списка вовлеченных были удалены виды, не соответствующие критериям по числу особей. Во-первых, показана высокая степень ассоциированности следующих видов-хозяев с субтипами: черная кряква - H5N3 субтип; широконоска - H2N1 субтип; клектун - H6N6 субтип; косатка - H3N2 субтип; нырок красноголовый - H3N2 субтип; чайка сизая - H3N2 и H16N3 субтипы; чайка серебристая - H13N8 субтип; чайка тихоокеанская - H11N8 и H13N6 субтипы. В целом анализ для всех 44 субтипов показал сложную картину с большим разбросом значений. Это может быть связано с небольшим количеством изолятов некоторых субтипов для подобного анализа. В связи с этим мы провели отдельный анализ ассоциированности вида с каждым субтипом нейраминидазы и гемагглютинаина (рисунок 7).

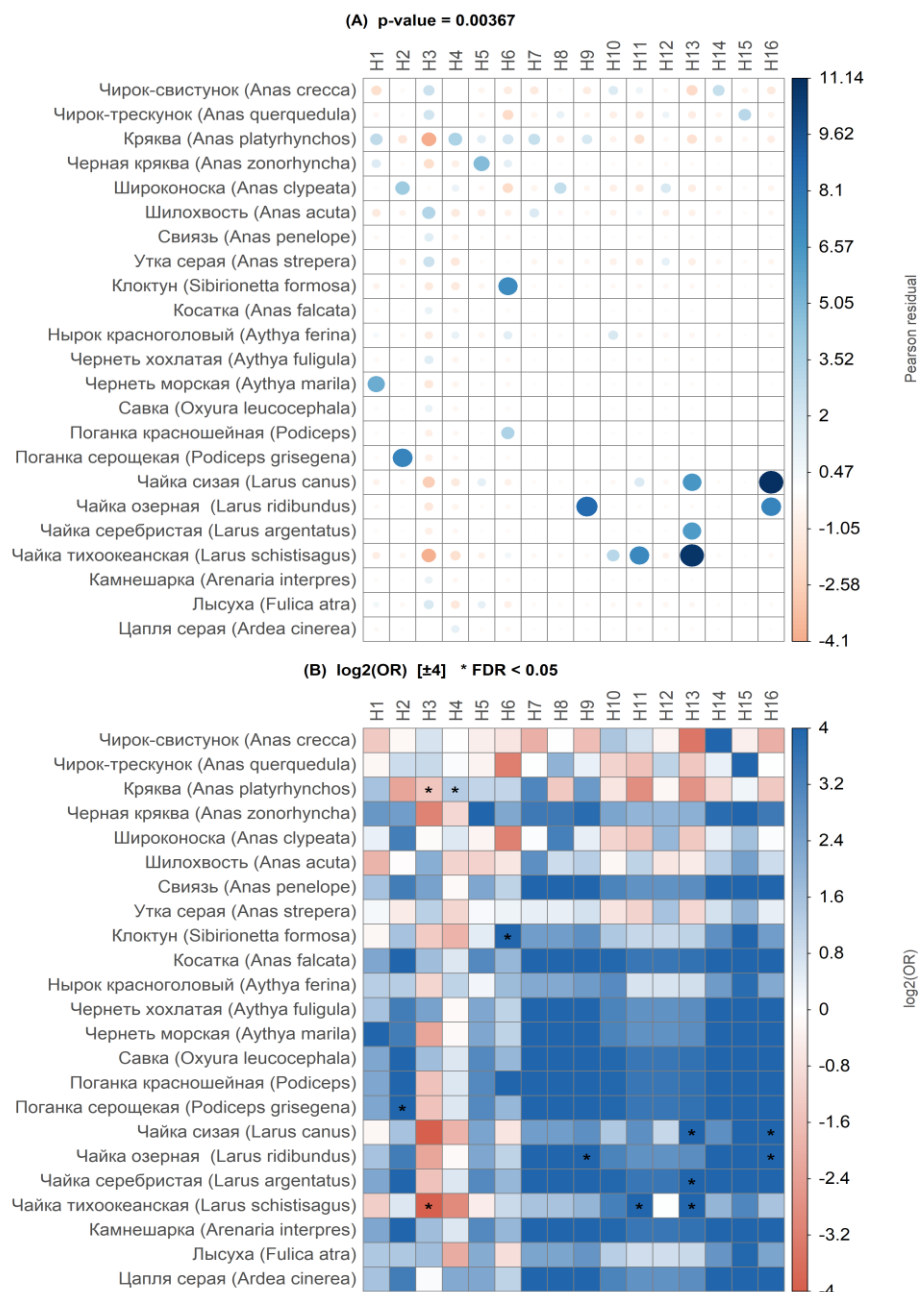


Рисунок 7 – Анализ ассоциированности между субтипами НА и видами хозяев в выборке. (А) Стандартизированные остатки Пирсона по результатам теста хи-квадрат с симуляцией методом Монте-Карло ($B = 3000$). (В) Парные отношения шансов (OR) для каждой комбинации субтип НА-вид хозяина в логарифмической шкале (\log_2); рассчитаны с поправкой Холдейна (+0,5 ко всем ячейкам), шкала ограничена значениями ± 4 . Синий цвет соответствует комбинациям, встречающимся чаще ожидаемого ($\text{OR} > 1$), красный — реже ($\text{OR} < 1$).

Подтвердились антагонистическая ассоциированность между H3 и H4 и чирками и кряквой. Показана положительная ассоциированность для такого распространенного субтипа как H1N1 с кряквой, и одновременно явная отрицательная ассоциированность этого субтипа с основными хозяевами – видами чирков. Следующим этапом был анализ ассоциированности различных субтипов с регионом обнаружения (рисунок 8).

Географические паттерны субтипов, выявленных при обследовании 34835 особей диких птиц, впервые продемонстрировали дифференциальную картину.

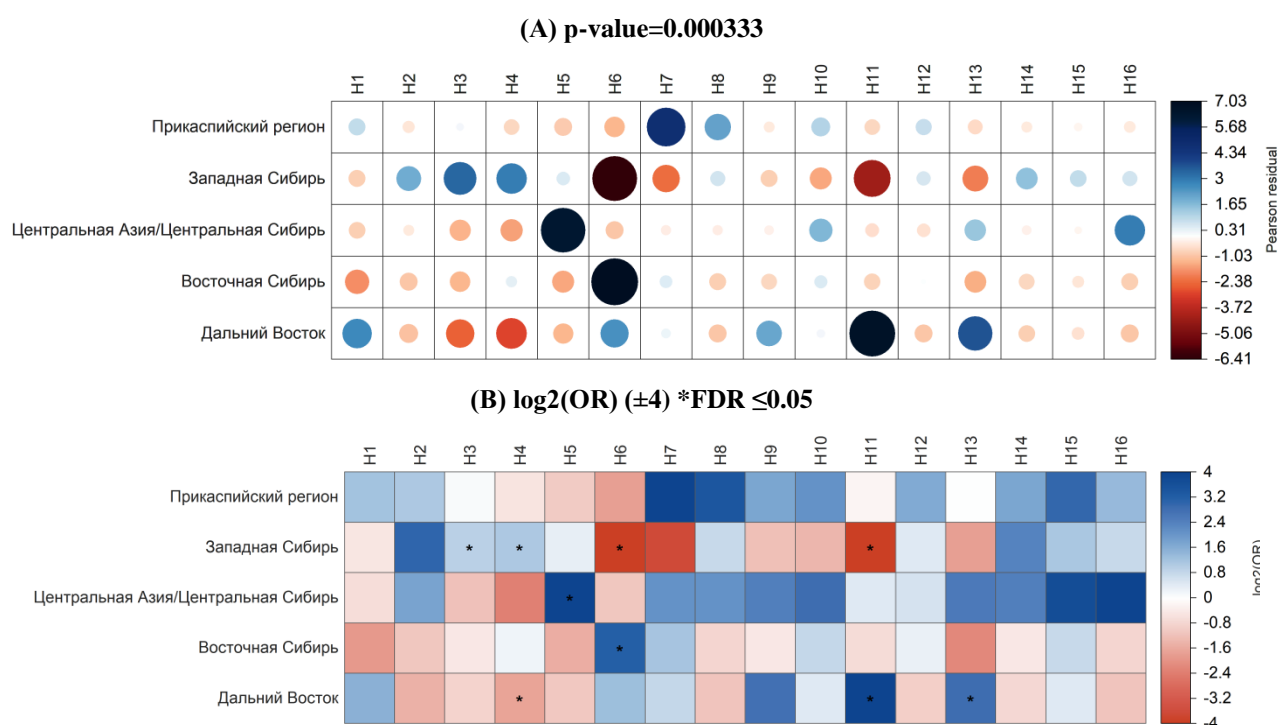


Рисунок 8 – Анализ ассоциированности между субтипами НА и исследованными географическими территориями. (А) Стандартизированные остатки Пирсона по результатам теста хи-квадрат с симуляцией методом Монте-Карло ($B = 3000$). (В) Парные отношения шансов (OR) для каждой комбинации субтип НА-регион в логарифмической шкале (\log_2); рассчитаны с поправкой Холдейна (+0,5 ко всем ячейкам), шкала ограничена значениями ± 4 . Синий цвет соответствует комбинациям, встречающимся чаще ожидаемого ($OR > 1$), красный — реже ($OR < 1$).

При проведении анализа ассоциированности субтипов поверхностных белков с географическими зонами, показаны следующие закономерности:

1. обнаружена достоверная ассоциированность для самых распространенных субтипов H3N8 и H4N6 с территориями Западной Сибири, и отрицательная для других регионов.
2. распространённый субтип H1N1 больше ассоциирован с территорией Дальнего Востока.
3. вирусы H6 субтипа ($n=37$) ассоциированы с территориями Восточной Сибири и Дальнего Востока – такая приуроченность характерна для большинства из многочисленных H6 вирусов, за исключением трех изолятов из Новосибирской области ((H6N2 (=2) и H6N8 ($n=1$) субтипов)).
4. обнаружена достоверная ассоциированность субтипа H6N6 с территорией Дальнего Востока, куда мы включили и районы Амурской области с наиболее многочисленными изолятами (глава 3.3.3). Ранее мы показали достоверную ассоциированность H6N6 субтипа с видом-хозяином – клектуном. В целом H6 нейраминидаза оказалась достоверно ассоциирована с Восточной Сибирью и Дальним Востоком и имеет достоверную отрицательную ассоциированность с территориями Западной и центральной Сибири. Далее нами рассмотрена наиболее вероятная причина подобного распространения нейраминидазы H6 – миграции генов H6 из «куриной» линии вируса, предположительно с территории Северо-Восточного Китая, который проникает на Дальний Восток и Приамурье с миграциями диких птиц (глава H6Nx).
5. для вирусов H2 субтипа ($n=5$) характерно обнаружение только в Западной Сибири, при этом три изолята H2N1 выделены только от широконоски, а два изолята H2N3 – от птиц, принадлежащих, видам поганка серошекая и чирок-свистун.
6. выявленные вирусы H7 субтипа были также немногочисленны, всего четыре изолята: два H7N3 из Прикаспия, один изолят H7N7 из Якутии и один изолят H7N1 с полуострова Камчатка.

7. обнаружена ассоциированность вирусов H11 субтипа (n=13) с видами хозяев и регионом. Все они выделены на территории Дальнего Востока, при этом вирусы H11N8 субтипа выделялись только от птиц семейства чайковых (три вида), а вирусы H11N9 субтипа – только от речных уток двух видов. Исключение составил один изолят H11N8, выделенный от кряквы обыкновенной в Амурской обл. в 2008 г.
8. обнаружено, что H13 субтип (n=11), подтвержденный нами только у чайковых птиц, был ассоциирован для субтипа H13N6 исключительно с чайкой тихоокеанской (*Larus schistisagus*) Камчатки и Сахалина, а субтип H13N2 – с сизой чайкой (*Larus canus*) Западной Сибири.

Очевидно, что представленность видов отличается по регионам. Однако, в целом исследование ассоциированности вирусов с видами и регионами дает цельную картину распределения паттернов вирусов в азиатской части РФ – а по своей сути основных территорий диких водоплавающих в период размножения на территории Северной Евразии. Глава «Генетическое разнообразие» дополняет картину, выявляя общие закономерности и отличия таких паттернов по результатам филогенетического анализа сегментов геномов в сравнении с вирусами, выявленными на зимовках диких птиц (Китай, страны Средней и Юго-Восточной Азии). Нами обнаружено неравномерное выявление для разных субтипов в течение года. Так для распространенного субтипа H1, N1, H1N1, субтипов H5, H7, N7 характерна ассоциированность с зимне-весенним периодом. Интерпретацию результатов в отношении обнаруженного в весенний период субтипа H16 мы не проводили, по причине малой выборки. Интересно, что H5 субтип в составе высокопатогенных вариантов HPAI ассоциирован у диких птиц с весенним периодом, тогда как H5 в составе низкопатогенных LPAI ассоциирован с августом месяцем. Для субтипов H10, H12, H13 характерна ассоциированность с поздним осенним периодом (октябрь–декабрь).

Таким образом, на основании исследованной выборки птиц и коллекции вирусов впервые проанализирована ассоциированность поверхностных белков вируса гриппа HA и NA отдельных субтипов с видом хозяина, географическим регионом, сезоном года для территории Северной Азии. Предложена концепция географической гетерогенности распространения вируса гриппа на территории Северной Азии. В частности, впервые обнаружена достоверная ассоциационность для самых распространенных субтипов H3N8 и H4N6 с территориями Западной Сибири, и ее отсутствие для других регионов. В то время как распространённый субтип H1N1 достоверно больше ассоциирован с территорией Дальнего Востока. Показана достоверная ассоциационность субтипа H6N6 с территорией Дальнего Востока. Обнаружена и проанализирована достоверная ассоциационность различных субтипов вируса гриппа с определенным видом хозяина из исследованной выборки. В частности, самый распространенный субтип H3N8 достоверно ассоциирован с чирком-трескунком и чирком-свистунком, но имеет строгую отрицательную ассоциационность с кряквой. В то время как второй по распространенности субтип H4N6 наоборот имеет достоверные показатели ассоциационности с кряквой и не имеет таковой для указанных видов чирков.

2.4 Генетическое разнообразие вируса гриппа птиц в Азиатской части России в период 2007–2020 гг.

В результате нашего исследования мы получили 2318 последовательностей различных сегментов генома изучаемых штаммов, которые были депонированы в международные базы данных. При этом мы опубликовали 267 полных геномов. Для ряда штаммов удалось получить частичные нуклеотидные последовательности. Все они использовались для формирования выравниваний и молекулярно-биологического и филогенетического анализа, как для отдельных сегментов генома, так и для сравнительного генетического анализа всего генома для отдельных субтипов вируса, а также поиска событий реассортации. Впервые нам удалось показать кластеризацию по различным параметрам штаммов, циркулирующих на большой территории азиатской части РФ за более чем десятилетний период. Для этого мы предложили использовать цветовую дифференциацию ветвей и листьев филогенетических деревьев и придерживались ее на протяжении всего анализа для различных сегментов.

На первом этапе были проанализированы сегменты внутренних белков вируса: сегментов белков полимеразного комплекса (PA, PB1, PB2), сегмента нуклеопротеина (NP), сегмента матричных белков (M) и сегмента неструктурных белков (NS). Для визуализации используется различный цвет штаммов на филогенетическом дереве в зависимости от территории выделения вируса (в соответствии с выбранными ранее условными регионами исследования). Для определения филогенетических взаимоотношений мы сначала проанализировали филогенетические связи только для впервые выявленных российских штаммов, для которых стали известны нуклеотидные последовательности. При этом при кластеризации использовали в качестве аут-группы сегменты штамма A/duck/Manitoba/1953 A / H10N7 PA EPI ISL 146010 1953 и A/chicken/Brescia/1902 A / H7N7 PB2 EPI ISL 69853 1902.

Далее, для части штаммов проведен более детальный филогенетический анализ с целью установления филогенетических связей с наиболее распространенными вариантами Евразии, и, в частности, Юго-Восточной Азии. Это было необходимо для обнаружения у диких птиц сегментов, присущих эндемичным вариантам вирусов домашних птиц, а также наличие сегментов, известных своей специфичностью относительно таксономических и экологических групп хозяев или географической специфичностью. В дальнейшем это позволило выявить события реассортации геномов вируса гриппа в зависимости от вида хозяина и территории сбора образцов. Для удобства визуализации ветви дерева окрашены следующими цветами, согласно выделению в обозначенных условных регионах: красным – штаммы, выделенные в Западной Сибири, главным образом в Новосибирской области; голубым – штаммы, выделенные на территории Дальнего Востока; синим – штаммы, выделенные на острове Сахалин (наиболее восточная часть Дальнего Востока); зеленым – штаммы, выделенные в Республиках Бурятия и Якутия (Восточная Сибирь). Отдельно лиловым цветом обозначены наиболее западные штаммы из Прикаспийского региона. Такой цветовой дифференциации ветвей и листьев деревьев мы придерживались на протяжении всей работы. Для ориентации по дереву на каждом рисунке представлена цветная схема в виде радиальной дендрограммы.

Так, филогенетический анализ сегмента PA показал, что в целом топология по сегменту обладает сложной структурой (рисунок 9). Так, очевидно, что существует наиболее ранняя, отделившаяся от ствола дерева клада, содержащая сегменты H6N6 вирусов курообразных. Также была обнаружена отдельная достоверная клада, содержащая штаммы подобные вирусам домашних птиц H9N2 и H5N1, выделенные нами в период с 2005 по 2010 гг. Впервые обнаружена филогенетически близкая к ней отдельная клада вирусов диких уток H3N8-субтипа, выделенных на острове Сахалин.

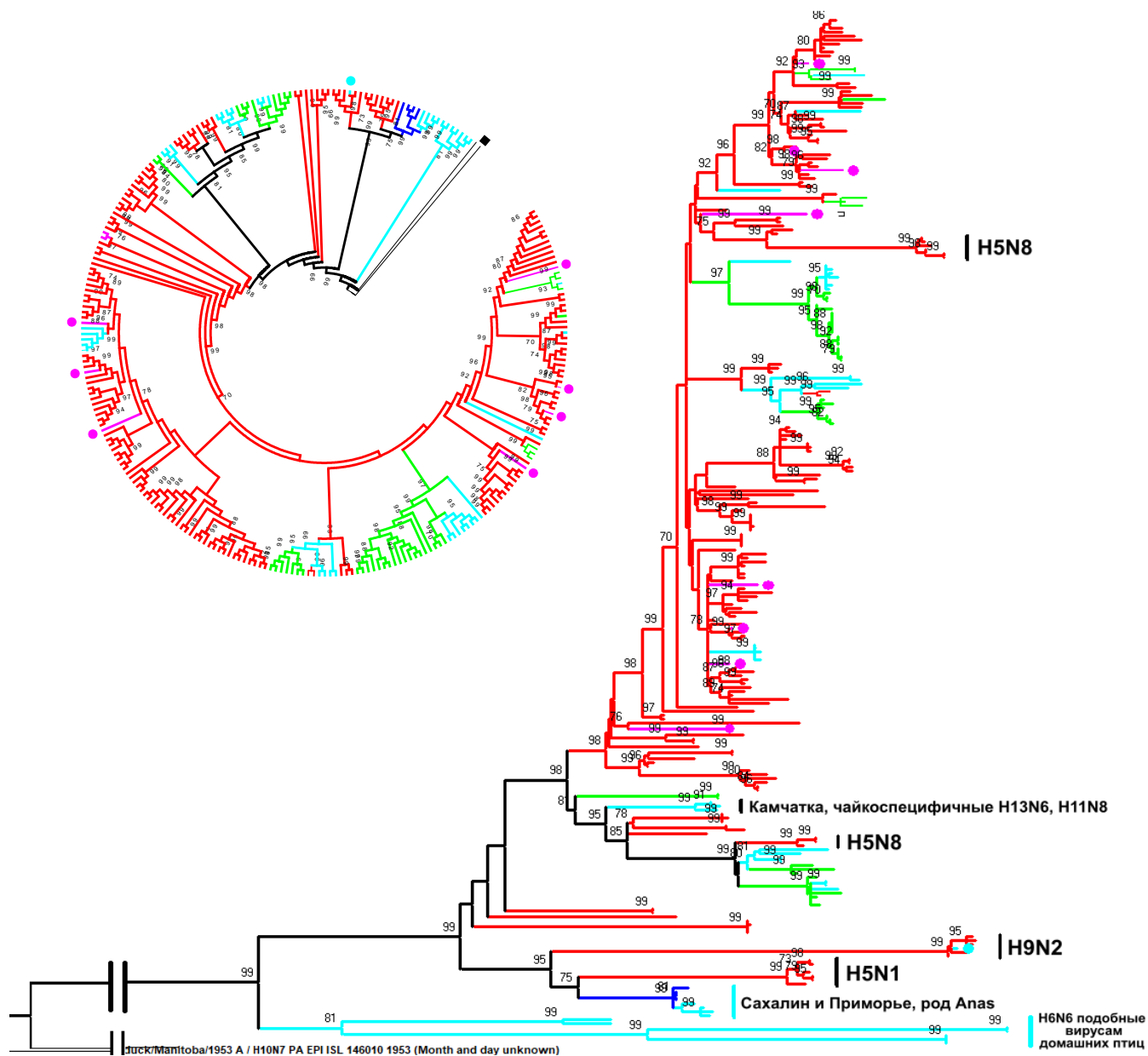


Рисунок 9 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома РА вирусов гриппа, выделенных на азиатской части РФ в период 2007–2020 гг. Дерево построено методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (1000 шагов репликации), значения бутстрэп-статистики указаны слева от ветвей. Красным показаны ветви со штаммами, выделенными в Западной Сибири; голубым – на территории Дальнего Востока; синим – на острове Сахалин; зеленым – в Республиках Бурятия и Якутия (Восточная Сибирь). Лиловым цветом обозначены штаммы из Прикаспийского региона. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт.

Наибольшая отдельная достоверная клада представлена, в основном, последовательностями РА вирусов Западно-Сибирского и Каспийского регионов, и обладает сложной топологией. Отдельной кладой представлены последовательности вирусов H13N6 и H11N8, выделенные от чаек на Камчатке, судя по всему, представляющие геномы видоспецифичных для чаек вирусов. Отдельно выделяется и клада новых вирусов H5N8, выделенных нами в 2020 г. на озере Убсу-Нур.

Внутри этой клады, в основном, представленной Западносибирскими штаммами, обнаружена отдельная клада Восточно-Сибирских последовательностей, выделенных в Бурятии и Якутии (отмечены зеленым).

Примечательно, что на дереве присутствует две отдельные отдаленные клады этого сегмента для вирусов H5N8: выделенных во время эпизоотий 2016 и 2020 гг., что свидетельствует в пользу гипотезы о разном происхождении и источнике сегментов этих вариантов.

По такому же принципу проанализированы другие 5 сегментов, кодирующих внутренние белки PB1, PB2, NP, M и NS (результаты в автореферате не приводятся). Проанализированы замены этих сегментов, ранее описанные как критические в отношении биологических свойств вируса. Например, известно, что вовлеченность сегмента PA в множественные реассортации, в комплексе со специфическими мутациями, может приводить к возникновению вариантов с повышенным патогенным потенциалом. Такой случай описан в 2021–2022 гг., для высокопатогенного вируса H5N1 в Африке (Буркина-Фасо), который содержал вариант сегмента PA от куриных вирусов H9N2 (Ouoba et al., 2022). В результате филогенетического анализа сегментов PA, PB1, PB2, NP, MP и NS были установлены следующие факты:

1. На всех деревьях сегментов полимеразного комплекса отображается основная, самая большая клада, состоящая в основном из западносибирских низкопатогенных вирусов.
2. Отдельно от нее всегда обособлены H6N6 вирусы диких птиц, которые являются куриноподобными китайскими, вероятно, имеющими происхождение от них.
3. Обособлены вирусы H5N1-субтипа, выделенные нами о диких и домашних птиц в период 2005–2020 гг.
4. На большинстве деревьев обособлена клада вирусов, выделенных нами от чаек.
5. Практически для всех сегментов характерны отдельные клады вирусов H9N2-субтипа, выделенных нами от домашних и диких птиц.
6. Для каждого сегмента достоверно выделяется специфическая клада вирусов из Якутии.
7. Не обнаружена кластеризация сегментов из Каспийского региона с любыми отдельными достоверными восточносибирскими и дальневосточными кладами, а также видоспецифичными кладами, которые удалось дифференцировать.
8. Сегменты внутренних белков высокопатогенных вариантов H5N1 и H5N8 не принадлежат одним кладам, не имеют близких филогенетических взаимоотношений, и, вероятно, не имеют общих предковых вирусов, что может говорить о различном происхождении и множественных событиях реассортации.

В других исследованиях также изучена панорама филогенетического разнообразия вирусов гриппа на основе последовательностей шести сегментов внутренних белков. Чен и др. на основе масштабного филогенетического анализа шести сегментов внутренних белков предложили универсальную систему номенклатуры для вирусных линий и сублиний (Chen et al., 2009). Были построены панорамные филогенетические деревья шести сегментов внутренних белков ВГА. Линии и сублинии внутри типа на основе шести внутренних генов были классифицированы и обозначены предварительной универсальной числовой номенклатурной системой. Было проанализировано разнообразие вирусов гриппа, циркулирующих в различных регионах, периодах и хозяевах на основе панорамных деревьев. В целом такой подход, как и в случае панорамных деревьев для азиатской части России, имеет ряд ограничений и отражают лишь часть реальности (Chen et al., 2009); ограничения были описаны в диссертации.

В заключении необходимо отметить, что в нашем исследовании впервые представлены целостные представления о филогенетическом разнообразии и распространении вирусов гриппа типа А на основе их шести сегментов внутренних белков на территории Северной Азии. Они могут стать подходящей основой для обобщения результатов будущего изучения вирусов и будут способствовать дальнейшему научному обмену информацией о филогенетическом разнообразии и эволюции вирусов.

Для общего панорамного филогенетического анализа всех исследованных нами сегментов HA (2007–2020) мы построили радиальную дендрограмму (рисунок 10).

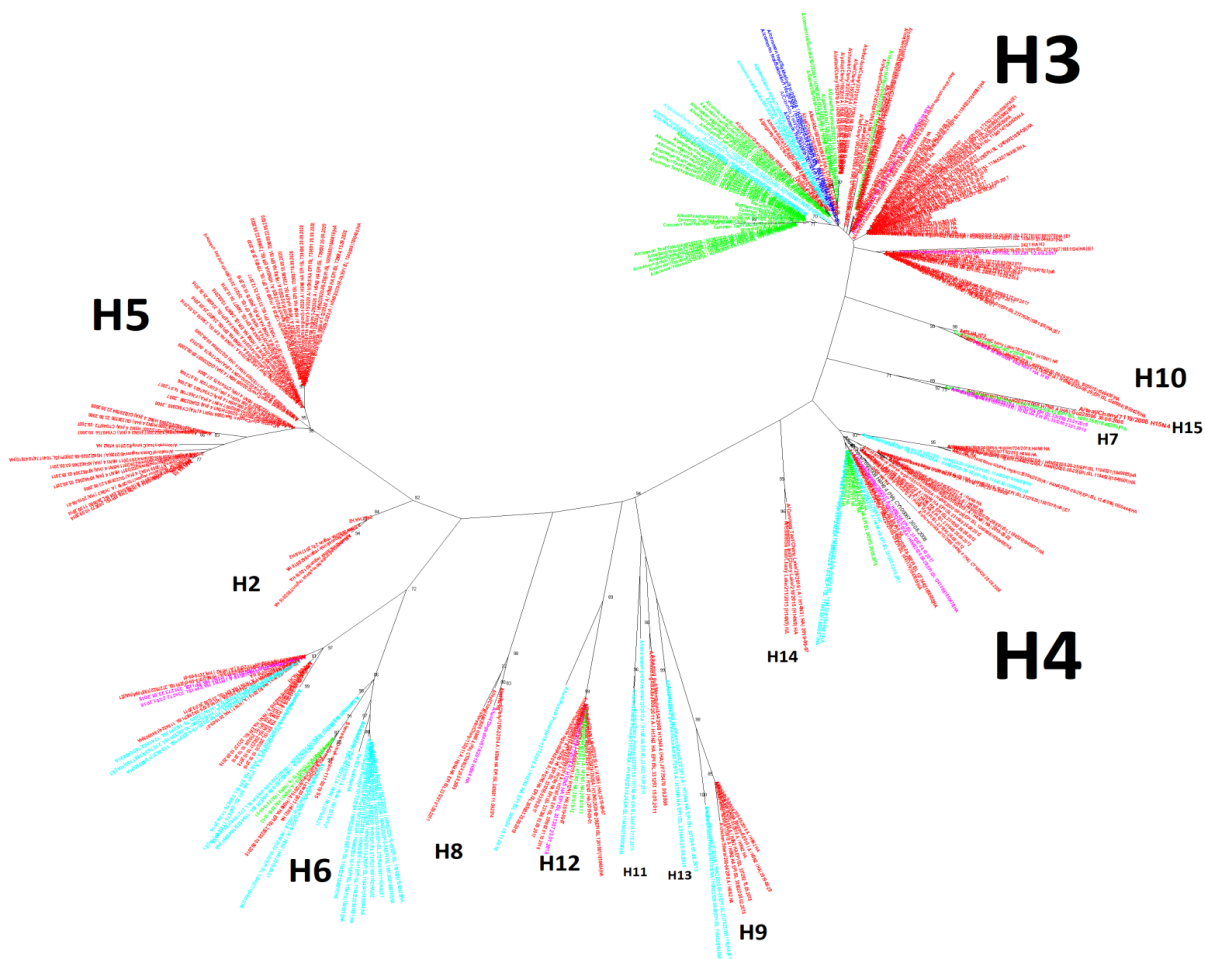


Рисунок 10 – Радиальная филогенетическая дендрограмма на основе всех выделенных нами последовательностей сегмента HA (2007–2020). Красным показаны штаммы, выделенные в Западной Сибири; голубым – на территории Дальнего Востока; синим – на острове Сахалин; зеленым – в Республиках Бурятия и Якутия (Восточная Сибирь). Лиловым цветом обозначены штаммы из Прикаспийского региона.

В результате показано, что ее топология соответствует известной эволюционной истории сегмента HA (Suzuki and Nei, 2002). Представлены все субтипы гемагглютининов H1–H16, визуально изображение отражает количество изученных изолятов (количество листьев дерева) разных субтипов. Следует отметить, что в большинстве случаев наблюдается четкая территориальная кластеризация изолятов определенных субтипов. Так, наблюдаются достоверные, территориально отличные клады по таким наиболее распространенным субтипам как H3Nx (Западносибирская, Восточносибирская, Дальневосточная) и H6Nx (Дальневосточная и Сибирская). Для H6 субтипа даже на панорамном дереве характерны достоверные клады по ранее описанным линиям диких и домашних птиц. Для общего панорамного филогенетического анализа всех исследованных нами сегментов HA (2007–2020) мы также построили радиальную дендрограмму. В результате показано, что ее топология соответствует известной эволюционной истории сегмента NA (Fouchier et al., 2005b; Xu et al., 2012). Представлены все субтипы нейраминидазы N1–N9, визуально изображение отражает количество изученных изолятов (количество листьев дерева) разных субтипов. Следует отметить, что в большинстве случаев наблюдается четкая территориальная кластеризация изолятов определенных субтипов. Так, наблюдаются достоверно отличные территориально клады по таким наиболее распространенным субтипам как HxN2 (Дальневосточная и Сибирская), HxN8 (Западносибирская, Восточносибирская, Дальневосточная) и HxN6 (Западносибирская, Восточносибирская, Дальневосточная). Для N6 субтипа даже на панорамном дереве характерны достоверные клады по ранее описанным линиям диких и домашних птиц. Необходимо отметить, что крайне важно учитывать ряд ограничений подобного панорамного дерева, указанных выше.

2.5 Комплексный анализ филогенетических связей сегментов геномов: доказательства реассортации вируса гриппа птиц в Азиатской части России

Для комплексного анализа филогенетических связей всех восьми сегментов генома вирусов гриппа, мы выбрали пул вирусов, циркулировавших на Дальнем Востоке РФ. Результаты были объединены в таблице 3.

Таблица 3 – Геномный состав штаммов ВГА, выделенных от диких птиц в Дальневосточном регионе в период с 2016 по 2020 гг.

		PB2	PB1	PA	NP	MP	NS	HA	NA
A/gadwall/Russia_Primorje/394/2016	H1N1	EA	FE	FE	FE	EA	FE	FE	FE
A/teal/Russia_Primorje/390/2016	H1N1	EA	FE	FE	FE	EA	FE	FE	FE
A/mallard/Russia_Primorje/166T/2020	H1N1	FE	FE	FE	FE	EA	FE	EA	FE
A/mallard/Russia_Primorje/94T/2020	H1N1	FE	FE	FE	FE	NA	FE	EA	FE
A/spot-billed_duck/Primorje/114T/2020	H1N1	FE	FE	FE	FE	NA	FE	EA	FE
A/Common Teal/Sakhalin/OD15/2019	H3N8	FE	FE	FE*	FE	FE	NA	FE	NA
A/Common Teal/Sakhalin/OD17/2019	H3N8	FE	FE	FE*	EA	FE	NA	FE+NA	NA
A/Common Teal/Sakhalin/OD18/2019	H3N8	FE	FE	FE*	FE	FE	NA	FE	NA
A/Common Teal/Russia_Primorje/177/2019	H3N8	EA	NA	FE	FE	NA	EA	NA	NA
A/Common Teal/Russia_Primorje/94/2019	H3N8	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE
A/Mallard/Russia_Primorje/182/2019	H3N8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A/Northern Pintail/Russia_Primorje/298/2019	H3N8	FE	FE	FE*	FE	FE	EA	FE+NA	NA
A/northern_pintail/Russia_Primorje/96T/2020	H3N8	FE	FE	EA	FE*	FE	FE	FE	NA
A/common_teal/Russia_Primorje/113T/2020	H3N8	FE	EA	EA	FE*	FE	FE	FE	NA
A/common_teal/Sakhalin/110c/2020	H3N8	FE	FE	EA	FE	FE	NA	FE	NA
A/common_teal/Sakhalin/66c/2020	H3N8	FE	EA	FE*	FE*	FE	FE	FE+NA	NA
A/common_teal/Sakhalin/81c/2020	H3N8	FE	FE	EA	FE	FE	NA	FE	NA
A/mallard/Russia_Primorje/844/2017	H4N6	FE	EA	FE	EA	FE	FE	FE	EA
A/Mallard/Russia_Primorje/153/2019	H4N6	FE	FE	EA	FE	FE	FE	FE	EA
A/mallard/Russia_Primorje/3T/2020	H4N6	FE	FE	FE*	FE	FE	FE	FE	EA
A/mallard/Russia_Primorje/88T/2020	H4N6	FE	FE	FE*	FE	FE	FE	FE	EA
A/Spot-billed Duck/Russia_Primorje/226/2019	H5N3	FE	FE*	FE*	FE*	FE	FE	FE	FE
A/Spot-billed Duck/Russia_Primorje/262/2019	H5N3	FE	EA	FE	FE	FE	EA	FE	FE
A/Spot-billed Duck/Russia_Primorje/173/2019	H6N1	FE	EA	FE	FE	EA	FE	FE	FE
A/mallard/Russia_Primorje/101T/2020	H6N2	FE	FE	FE	FE	NA	FE	ChP	FE
A/mallard/Russia_Primorje/181T/2020	H6N2	FE*	FE	FE*	FE	FE	FE	FE	FE
A/Mallard/Russia_Primorje/129/2019	H6N6	FE	FE	ChP	ChP	ChP	ChP	ChP	FE
A/Northern Pintail/Russia_Primorje/137/2019	H6N6	ChP	FE	FE*	ChP	ChP	ChP	ChP	FE
A/common_pochard/Russia_Primorje/124T/2020	H6N6	ChP	ChP	ChP	ChP	ChP	ChP	ChP	ChP
A/common_pochard/Russia_Primorje/140T/2020	H6N6	ChP	ChP	ChP	ChP	ChP	ChP	ChP	ChP
A/common_teal/Russia_Primorje/282T/2020	H6N6	FE	ChP	ChP	ChP	ChP	FE	ChP	ChP
A/mallard/Primorje/103T/2020[A / H6N6	H6N6	ChP	ChP	EA	ChP	ChP	ChP	ChP	ChP
A/mallard/Primorje/183T/2020[A / H6N6	H6N6	ChP	ChP	EA	ChP	ChP	ChP	ChP	ChP
A/mallard/Russia_Primorje/108T/2020	H6N6	FE	ChP	FE	ChP	ChP	FE	ChP	ChP
A/mallard/Russia_Primorje/234T/2020	H6N6	FE	ChP	FE	ChP	ChP	FE	ChP	ChP
A/mallard/Primorje/83T/2020	H9N2	FE	FE	FE	FE	NA	FE	FE	FE
A/mallard/Russia_Primorje/48T/2020	H9N2	FE	FE	FE	FE	NA	FE	FE	FE
A/pintail/Russia_Primorje/222/2015	H11N9	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE
A/Mallard/Russia_Primorje/254/2019	H11N9	FE	FE	FE	FE	FE	NA	FE	FE
A/Mallard/Russia_Primorje/260/2019	H11N9	FE	FE	FE	FE	FE	NA	FE	FE
A/Mallard/Russia_Primorje/74/2019	H11N9	FE	FE	FE	FE	FE	NA	FE	FE
A/mallard/Russia_Primorje/218T/2020	H11N9	FE	FE	FE*	FE	NA	EA	FE	FE
A/teal/Russia_Primorje/18-137T/2018	H12N2	FE*	FE	FE	NA	FE	NA	NA	FE

Примечание. Введены следующие аббревиатуры и обозначения с цветовой дифференциацией:

FE (Far East) – филогенетические группы относящиеся к Евразийской генетической линии вирусов гриппа птиц, в основном в пределах региона; **FE* (Far East*)** – филогенетические группы, филогенетически дистанцированные от ветвей дендрограммы, содержащих нуклеотидные последовательности основного пула дальневосточных вариантов вируса; **FE+NA (Far East+North America)**, отмеченные градиентной желто-зеленой заливкой) – филогенетические группы, состоящие из нуклеотидных последовательностей сегментов геномов штаммов, выделенных как на территории Дальнего Востока Евразии, так и в Северной Америке.

EA (Eurasia) – филогенетические группы, циркулирующие за пределами этого региона;

NA (North America) – филогенетические группы, состоящие преимущественно из выделенных в Северной Америке и относящихся к Северо-Американской генетической линии вирусов гриппа птиц;

ChP (China Poultry) – филогенетические группы, состоящие из штаммов субтипов H6N6 и H9N2, изначально локально циркулировавших в популяциях домашних птиц на территории Китая;

Таким образом, построена таблица, отображающая географию распространения штаммов вируса гриппа птиц, по первичной структуре сегментов генома филогенетически схожих с изолятами вируса, выделенными от диких водоплавающих птиц на Дальнем Востоке РФ. В результате субтипирования показано, что генетическое разнообразие вирусов гриппа диких перелетных птиц, выделенных на Дальнем Востоке РФ с 2015 по 2020 гг., было представлено десятью субтипами. Геномы исследованных штаммов преимущественно представлены сегментами, характерными для вариантов вируса гриппа диких перелетных птиц, распространенных на Дальнем Востоке Евразии. Однако, согласно филогенетическому исследованию, среди сегментов геномов штаммов из Приморья и Сахалина встречаются схожие, в том числе, с сегментами вариантов вируса, выявленных в центральной и европейской частях Евразии. Также, согласно филогенетическим дендрограммам, в филогенетическом окружении ряда геномных сегментов российских штаммов с Дальнего Востока присутствуют отдельные нуклеотидные последовательности сегментов вирусов гриппа, выделенных в Бангладеш и Египте.

Среди диких перелетных птиц на Дальнем Востоке РФ выявлена циркуляция вирусов гриппа субтипа H6N6 и H6N2, геномы которых полностью или частично подобны генетическим вариантам вируса, локально циркулирующим в популяциях домашней птицы на территории Китая. Штамм A/mallard/Russia_Primorje/101T/2020 субтипа H6N2 содержит один сегмент (HA), а все девять штаммов субтипа H6N6, выделенных в Приморье в 2019 и 2020 гг., содержат от пяти до восьми сегментов генома, характерных для китайских вирусов гриппа домашних птиц.

Выявлены частые случаи (21 штамм из 43) реассортации и заносов вируса, при которых от одного до восьми сегментов генома вирусов гриппа из Приморья и с Сахалина генетически схожи с вариантами вируса, циркулировавшими на территории Северной Америки (США, Канада) и принадлежащими к Северо-Американской генетической линии. Штамм A/Mallard/Russia_Primorje/182/2019 субтипа H3N8 по всем 8 сегментам генома подобен Северо-Американским изолятам вируса гриппа птиц и, вероятно, появился на Дальнем Востоке РФ не в ходе реассортации, а в результате заноса перелетными птицами.

Выявлен случай двойной реассортации: штамм A/mallard/Russia_Primorje/101T/2020 субтипа H6N2 содержит сегмент HA, характерный для китайских штаммов вируса гриппа домашней птицы, а также сегмент MP Северо-Американской генетической линии, при том, что все прочие сегменты генома принадлежат Евразийской генетической линии и характерны для вирусов гриппа диких водоплавающих птиц, циркулирующих на Дальнем Востоке.

В результате исследования генетического разнообразия ВГА в Азиатской части России в период 2007–2020 гг. можно сделать следующие выводы:

1. Пул вирусов гриппа, обнаруженный нами в данном исследовании в популяциях диких перелетных птиц Дальнего Востока РФ (Приморье и Сахалин), характеризуется значительным генетическим разнообразием: представлен 10 субтипами (H1N1, H3N8, H4N6, H5N3, H6N1, H6N2, H6N6, H9N2, H11N9 и H12N2), содержит реассортантные варианты (между основными генетическими линиями, между вирусами диких и домашних птиц, а также двойной реассортант).

2. Филогенетические связи большинства сегментов исследованных штаммов указывают на то, что схожие варианты вируса гриппа птиц ожидаемо преимущественно циркулируют на Дальнем Востоке Евразии (от Японии до Монголии). Однако сходство отдельных сегментов ряда штаммов с генетическими вариантами вируса, выделенными в Новосибирской области, Дагестане, Дании, Бельгии, Германии, Египте и Бангладеш, указывает на распространение генетического материала вируса гриппа птиц относительно Дальнего Востока как в меридиональном, так и в широтном направлениях.

3. Среди диких перелетных птиц на Дальнем Востоке РФ выявлена циркуляция вирусов гриппа субтипа H6N6 и H6N2, геномы которых полностью или частично подобны генетическим вариантам вируса, локально циркулирующим в популяциях домашней птицы на территории Китая. Штамм A/mallard/Russia_Primorje/101T/2020 субтипа H6N2 содержит один сегмент (HA), а все девять штаммов субтипа H6N6, выделенных в Приморье в 2019 и 2020 гг. содержат от пяти до восьми сегментов генома, характерных для китайских вирусов гриппа домашних птиц. Таким

образом, показана масштабная трансмиссия и реассортация патогена из популяций домашних птиц в популяции диких перелетных птиц, что влечет за собой появление и распространение новых вариантов вируса.

4. Выявлены множественные случаи реассортации дальневосточных вариантов вируса гриппа, принадлежащих Евразийской генетической линии, с вариантами вируса Северо-Американской генетической линии, циркулировавшими в Канаде и США.

5. Выявлен случай двойной реассортации: штамм A/mallard/Russia Primorje/101T/2020 субтипа H6N2 содержит сегмент HA, характерный для китайских штаммов вируса гриппа домашней птицы, а также сегмент M Северо-Американской генетической линии, при том, что все прочие сегменты генома принадлежат Евразийской генетической линии и характерны для вирусов гриппа диких водоплавающих птиц, циркулирующих на Дальнем Востоке.

6. Обилие субтипов и паттерны распределения штаммов по филогенетическим группам в зависимости от анализируемого сегмента генома, а также выявление случаев реассортации и трансмиссии между домашними и дикими птицами указывают на процессы появления все новых вариантов вируса, в т.ч. высокопатогенных. Многочисленные, разнообразные и устойчивые филогенетические связи между вариантами вируса гриппа птиц, циркулирующих на Дальнем Востоке Евразии, указывают на необходимость постоянного и своевременного исследования генетического разнообразия патогена в странах региона (Россия, Китай, Япония, Корея, Вьетнам), т.к. при выявлении в одной из стран нового варианта вируса, в т.ч. обладающего высокой патогенностью, можно ожидать его появления в других странах региона.

Ранее была показана значительная варибельность частоты реассортаций среди различных субтипов вируса гриппа. В частности, субтипы H5, H6, H7 и H9 обнаружили меньшую частоту реассортаций по сегментам внутренних белков по сравнению с другими субтипами. Среди них H5 и H9 имели самую меньшую частоту, в то время как субтипы H1, H4 и H3 показали высокие показатели частоты реассортации, особенно H1, у которого был самый высокий показатель по сегменту NS (нуклеопротеидов) – примерно 1,148 обменов в год (Lu et al., 2014). Было обнаружено также, что субтипы N1 и N2 имели более низкие показатели частот реассортации по сравнению с N3, N5, N6, N7 и N9. Что касается комбинаций субтипов HA-NA, то H5N1 и H9N2 показали значительно более низкие показатели частот реассортации во всех сегментах внутренних белков по сравнению с другими субтипами. Примечательно, что у H9N2 были самые низкие показатели частот реассортаций по сегментам PB2 и NS, в то время как у H5N1 были самые низкие показатели в нескольких других сегментах (Lu et al., 2014).

Полученные нами данные согласуются с основными положениями гипотезы о различных частотах реассортаций среди субтипов и подчеркивают сложные закономерности реассортации вирусов гриппа птиц, указывая на то, что некоторые субтипы более подвержены генетическому обмену сегментами, чем другие. Эти знания имеют решающее значение для понимания эволюции вирусов гриппа и их потенциального воздействия на общественное здравоохранение.

В целом, по результатам нашего исследования можно заключить, что внутрикладовое генетическое разнообразие в меньшей степени зависит от пространственного и временного фактора, чем от таксона хозяина или его типа в отношении «дикий» или «домашний». Подобная закономерность также показана специфически для вируса гриппа H5N1 в Европе (Ross et al., 2024).

2.6 Биологическое разнообразие вируса гриппа ряда отдельных LPAI субтипов в популяциях диких птиц Азиатской части России

В этой главе проанализировано генетическое разнообразие вирусов с позиции не отдельных сегментов, а в отношении целых геномов отдельных субтипов, а также некоторые биологические свойства штаммов.

Наибольший интерес, конечно, представляли субтипы редкие и уникальные. Частично филогенетические взаимоотношения сегментов внутренних белков для каждого рассматриваемого в данной главе субтипа, затронуты в предыдущей главе. Субтип H5Nx, представляющий отдельный интерес с точки зрения особых молекулярно-биологических и патогенных свойств высокопатогенных вариантов, представлен в отдельной главе 3.4. диссертации. В данной главе мы рассмотрели в основном филогенетические и молекулярно-

биологические свойства гемагглютинаина различных субтипов выделенного в данном исследовании вируса гриппа. Для некоторых наиболее интересных штаммов были изучены различные вирусологические свойства, что в дальнейшем дало возможность использовать их в прикладных исследованиях (отдельная глава 3.5 диссертации).

Актуальность исследований отдельных субтипов подчеркивается еще и тем, что некоторые низкопатогенные вирусы H3N8, H4N6 и H5N2 субтипов, которые являются одними из самых распространенных в природе, могут играть роль в перекрестном иммунитете против высокопатогенных вирусов H5N1. Это было показано при экспериментальном заражении кур с использованием коллекции вирусов канадских диких гусей, причем иммунитет лучше стимулировался гомологичными антигенами (H5), чем гетерологичными H3 и H4 (Berhane et al., 2010).

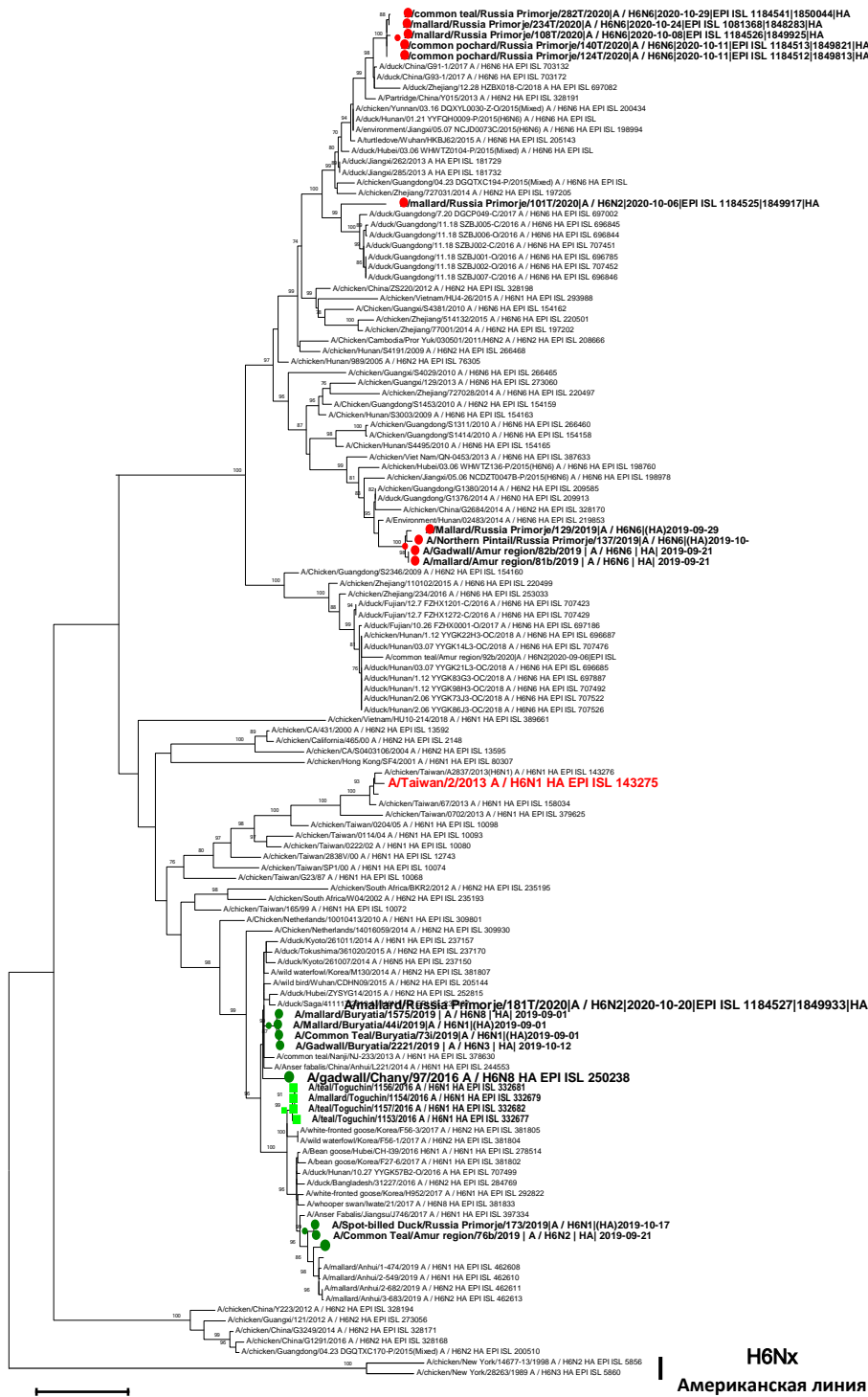
Одним из основных значимых этапов было исследование разнообразия и эволюции вирусов субтипа H6Nx. В ходе ежегодной программы наблюдения мы обнаружили высокий процент представленности вирусов гриппа H6Nx субтипа у диких птиц Северо-Восточной Евразии, которые включали в основном три региона России на границе с Китаем: Бурятию, Амурскую область и Приморский край. Мы выделили 37 изолятов H6, относящихся к пяти различным субтипам: H6N1, H6N2, H6N3, H6N6 и H6N8. Поскольку субтип H6 представляет угрозу для человека и известен как источник вирусных сегментов как дикого, так и домашнего происхождения, мы провели полногеномный анализ ряда штаммов и эксперименты для оценки патогенного риска. Мы обнаружили, что все исследованные штаммы H6 вируса по сегменту HA разделяются на две большие клады, хорошо известные для топологии общего дерева евразийских птичьих вирусов гриппа (рисунок 11).

Одна клада объединяет множество китайских вирусов, циркулирующих и, в основном, эндемичных для домашних птиц, включая рынки живой птицы. Наши 10 штаммов этой клады (отмечены красным), обозначенной CPL-H6Nx (China poultry-like lineage H6Nx), при этом принадлежат трем различным субкладам: двум субкладам утиных китайских вирусов, исключительно H6N6-субтипа и субкладе H6Nx вирусов куриных, в основном также содержащих H6N6. Все наши штаммы этой клады принадлежали субтипу H6N6.

Другие наши восемь штаммов (обозначены зеленым) различных субтипов H6N1, H6N2, H6N3, и H6N8 (исключая субтип H6N6) принадлежали другой большой кладе Евразийских низкопатогенных вирусов птиц H6 – WDL-H6Nx (Wild duck lineage H6Nx). Кроме того, мы включили в анализ четыре вируса H6-субтипа, выделенных ранее в Сибири и представленные коллективом Марченко В.Ю. в базе GISAID. Эти вирусы, отмеченные нами далее в анализе и филогенетических деревьях светло-зеленым квадратом, являются единственными вирусами, доступными в базе для изучаемого азиатского региона России.

Эти Западно-Сибирские вирусы обозначены нами как штаммы группы «Toguchin-H6N1». Клада включает множество вирусов различных низкопатогенных субтипов с территории всей Евразии. Примечательно, что в ней есть и единственный вызвавший заболевание человека с летальным исходом летальный вариант H6 – так называемая Тайваньская клада зоонозного H6N1 вируса гриппа птиц (отмечен красным шрифтом). Изученные нами изоляты не имеют близких филогенетических связей с этим вариантом.

Таким образом, мы предположили, что в Дальневосточных популяциях диких птиц, в основном уток рода *Anas*, присутствуют одновременно классические низкопатогенные H6Nx вирусы диких водоплавающих птиц и эндемичные для Китая вирусы H6Nx домашних птиц. Вся логика дальнейших исследований, посвященных субтипу H6Nx, построена на данной гипотезе.



Линия вирусов, подобных китайским вирусом домашних птиц (CPL-H6Nx)

Линия вирусов диких птиц (WDL-H6Nx)

H6Nx
Американская линия

Рисунок 11 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома НА (Н6) вирусов гриппа H6Nx, выделенных на азиатской части РФ в период 2007–2020 гг. Дерево построено методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (1000 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт.

- Для ее проверки, мы проделали следующую работу:
1. Филогенетический анализ всех сегментов генома;
 2. BLAST анализ, проверка фактов реассортаций;
 3. Антигенный анализ выявленных различных линий H6: «дикий» и «домашней»;
 4. Поиск свидетельств молекулярной эволюции этих линий.
- На основании филогенетического анализа стало понятно, что сегменты генома внутри одного

штамма могут относиться к различным филогенетическим группам/кладам, предполагая различное происхождение. Такое появление отличных филогенетически сегментов, генетический шифт, может происходить в результате реассортации. BLAST-анализ показал, что можно выделить три группы вирусов.

Первая – это низкопатогенные штаммы A/1575-H6N8, 2221-H6N3, 44i-H6N1, 73i-H6N1, 173-H6N1, 181T-H6N2 и 76b-H6N2. Они имеют исключительно сегменты низкопатогенных вирусов гриппа диких птиц, различных субтипов, кроме субтипа H6N6, в то время как вторая группа вирусов – A/82b-H6N6, A/81b-H6N6, 124T-H6N6, и 140T-H6N6 – исключительно сегменты эндемичных для Китая вирусов домашних птиц (кур и уток). Третья группа исследованных нами штаммов имеет смешанный геном, в котором присутствуют сегменты вирусов диких птиц и вирусов домашних птиц, циркулирующих в Китае. При этом в первой группе вирусов «диких уток» у штамма 181-H6N2 обнаружен сегмент NS, характерный для североамериканских диких уток. А в третьей группе «смешанных» вирусов обнаружен штамм 101-H6N2, имеющий сегмент MP, также характерный для североамериканских вирусов диких уток.

Таким образом, часть China poultry-like вирусов, называемых нами «смешанные» содержали часть генов полимеразного комплекса от вирусов диких уток (wild duck-like). Вероятно, это свидетельствует об адаптации вируса домашних птиц к диким уткам за счет событий реассортаций и приобретения полимеразных генов, для лучшей адаптации к репликации в организме диких птиц. Кроме того, не исключалась адаптивная мутационная изменчивость, которую мы оценили в дальнейшем.

Для всех выделенных вирусов H6Nx была определена 50 %-ная инфекционная доза в РКЭ (EID₅₀) и 50 %-ная инфекционная доза в культуре клеток MDCK (TCID₅₀). Все проанализированные вирусы эффективно размножались в РКЭ ($10^{7,8}$ – $10^{8,3}$ EID₅₀/мл) и клетках MDCK ($10^{5,0}$ – $10^{5,8}$ 50% TCID₅₀/мл) в аналогичных титрах (табл. 4).

Таблица 4 – Вирусологические характеристики исследованных вирусов H6Nx

Штамм	log ₁₀ TCID ₅₀ /mL	1 TCID ₅₀ /mL (log ₁₀ EID ₅₀ /mL)	log ₁₀ EID ₅₀ /mL	IVPI
A/1575	5.4 ± 0.3	2.9	8.3 ± 0.3	0
A/82b	5.6 ± 0.3	2.7	8.3 ± 0.2	0
A/81b	5.0 ± 0.2	2.9	7.9 ± 0.4	0
76b	5.4 ± 0.2	2.6	8.0 ± 0.2	0
2221	5.8 ± 0.3	2.0	7.8 ± 0.4	0
44i	5.3 ± 0.2	2.7	8.0 ± 0.3	0
73i	5.4 ± 0.2	2.4	7,8 ± 0.4	0
173	5.5 ± 0.3	2.6	8.1 ± 0.2	0
129	5.2 ± 0.2	2.6	7.8 ± 0.4	0
137	5.4 ± 0.2	2.6	8.0 ± 0.3	0

Чтобы определить патогенность вирусов H6Nx для цыплят, мы внутривенно ввели каждый вирус шестинедельным цыплятам и рассчитали IVPI. Все вирусы были низкопатогенными для цыплят: все цыплята выжили и не проявляли никаких клинических признаков заболевания в течение 10-дневного периода наблюдения после прививки (индекс внутривенной патогенности = 0) (таблица 4). Поскольку экспериментальная инфекция не привела к летальному исходу, мы содержали цыплят до 21 дня и взяли сыворотку для исследования сероконверсии и выявления перекрестной реактивности.

Чтобы определить антигенные различия между вирусами H6, мы провели антигенный анализ в РТГА, используя поликлональную куриную антисыворотку, полученную против этих вирусов.

Все изоляты продемонстрировали перекрестную реактивность со всеми куриными постинфекционными антисыворотками в рамках отдельной филогенетической группы, выявленной нами в результате филогенетического анализа (раздел 3.3.3.1.1). Однако вирусы из двух различных филогенетических групп показали более чем четырехкратные различия в титрах РТГА для антисыворотки по сравнению с гомологичными вирусами, что указывает на значимое

антигенное различие между этими двумя группами вирусов. Результаты представлены в таблице 5. Таким образом, были обнаружены две филогенетические группы, две клады вирусов, которые одновременно циркулируют в популяциях диких мигрирующих птиц. Для первой клады характерны вирусы диких уток северной Евразии, для второй – исключительно вирусы домашних птиц Китая. Мы проверили их антигенные различия в РТГА и обнаружили, что они значительно различаются, представляют различные антигенные группы. Результаты филогенетического и антигенного анализа коррелируют и однозначно показывают наличие двух различных групп вирусов.

Таблица 5 – Результаты исследования антигенной кросс-реактивности вирусов H6Nx в реакции торможения гемагглютинации

Куриные постинфек- ционные сыворотки	антигены									
	H6-WDL линия						H6-CPL линия			
	A/4 4i	A/7 3i	A/222 1	A/157 5	A/17 3	A/76 b	A/12 9	A/13 7	A/81 b	A/82 b
A/44i	640	256 0	2560	2560	640	1280	20	20	20	20
A/73i	160	640	320	320	160	160	20	20	20	20
A/2221	640	128 0	640	1280	320	640	5	20	5	20
A/1575	320	640	320	640	640	640	5	5	5	5
A/173	640	128 0	1280	1280	640	640	80	80	40	40
A/76b	320	640	1280	1280	320	640	40	40	80	80
A/129	5	5	5	5	20	5	640	640	640	320
A/137	5	5	5	5	20	5	320	640	640	320
A/81b	5	5	5	5	20	5	640	640	640	640
A/82b	5	5	5	5	20	5	640	640	2560	640

В целом, в данном разделе работы проведено исследование ряда вирусологических и молекулярно-биологических свойств низкопатогенных штаммов вируса гриппа следующих субтипов: H3Nx, H4Nx, H7Nx, H8Nx, H9N2, H10Nx, H11Nx, H12Nx, H13Nx и H14Nx. Для последнего предложены гипотезы о формировании разнообразия и проанализированы генетические паттерны.

2.7 Организация и результаты мониторинга высокопатогенного вируса гриппа H5Nx у диких птиц в Азиатской части России

Заключение по главе «Исследование высокопатогенного вируса гриппа в Азии»

В настоящей работе были исследованы особенности распространения различных вариантов высокопатогенного вируса гриппа H5Nx субтипов в период с 2005 по 2020 гг., а также основные биологические свойства отдельных штаммов-представителей каждого варианта. Создана большая коллекция штаммов, для которых изучены основные вирусологические и молекулярно-биологические свойства. Описаны уникальные случаи выявления у новых видов хозяев.

Нами принято непосредственное активное участие в комплексе Международных усилий по мониторингу высокопатогенного вируса гриппа в Азиатском регионе. На это был направлен целый ряд проектов (глава 3.4.1 диссертации)

Показано, что Западная Сибирь, благодаря физико-географическим особенностям, оптимальным условиям для гнездования и остановок во время миграции большого числа особей разных видов и популяций, играет ключевую роль в распространении высокопатогенного гриппа в Северной Евразии. Это, вероятно, и явилось причиной того, что первым очагом эпизоотии гриппа H5N1 в России стал юг Западной Сибири. При этом наблюдалась крупная эпизоотия как среди диких, так и домашних птиц. Ранее нами была сформулирована гипотеза о заносе высокопатогенных вариантов вируса гриппа А из Юго-Восточной Азии на целый ряд

озер Центральной Азии (граница России и Монголии). В июне 2009 г. нами исследована массовая гибель диких птиц на озере Убсу-Нур. Филогенетический анализ штаммов 2009 г. показал, что они принадлежат кладе 2.3.2 и имеют 99 % степень гомологии со штаммами вируса гриппа H5N1-субтипа A/whooper swan/Mongolia/8/2009 и A/whooper swan/Mongolia/2/2009, выделенными в Монголии в то же время. Нами была выдвинута гипотеза о высокой вероятности возникновения повторной вспышки гриппа среди птиц на данной территории, впервые оформленная в кандидатской диссертации автора. Гипотеза получила подтверждение в июне 2010 г., когда на озере Убсу-Нур нами вновь была зарегистрирована массовая гибель диких птиц. Следующим важнейшим подтверждением явилось обнаружение нового варианта вируса H5N8 клады 2.3.4.4 на этом озере в 2016 г. и его дальнейшее распространение по территории Евразии.

Таким образом, нам удалось оценить разнообразие в пределах больших клад/филогенетических групп, циркулировавших в азиатской части России за 20 лет. Схематическое итоговое дерево показывает общую топологию, филогенетические связи всех вирусов H5 субтипа, и однозначно показывает, что для изученных нами высокопатогенных вариантов характерна принадлежность изученных штаммов к четырем описанным ранеекладам, согласно классификации (Smith et al., 2015), а именно: 2.2, 2.3.2, 2.3.3.4 (рисунок 12) и 7.1. При этом все вирусы, изученные нами, можно хронологически распределить на следующие временные периоды циркуляции:

- период 2005–2008 гг. – клада 2.2;
- период 2009–2015 гг. – клада 2.3.2 (включая 2.3.2.1С);
- период 2016–2020 гг. – клада 2.3.3.4.

Также нами выявлено несколько субклад низкопатогенных вирусов H5Nx. Низкопатогенные вирусы представлены субтипами H5N1, H5N2 и H5N3 (рисунок 12).

Показана их сложная мозаичная картина по сегментам внутренних белков, когда присутствуют сегменты филогенетически отдаленных линий, предполагая события реассортаций.

На Центрально-Азиатских высокогорных озерах в ходе ежегодного мониторинга мы впервые выявили у диких птиц вирус HPAI H5N1 клады 7.1, который тесно связан с шаньсиподобным и вьетнамским вирусами, совместно циркулирующими среди домашних птиц. Это первое сообщение о кладе 7.1 H5N1 в озере Цинхай. Основываясь на филогенетическом анализе, мы полагаем, что вирус мог происходить из генного пула, который распространился во Вьетнаме, и китайских вирусов клады 7.1, распространенной среди домашних птиц.

Одним из важнейших результатов оптимизированного мониторинга является первое выявление в ключевой точке на оз. Убсу-Нур нового варианта вируса H5N8 клады 2.3.4.4-В летом 2016 г. Этот вариант H5NX HPAI 2016/2017 годов вызвал крупнейшую известную эпизоотию высокопатогенного гриппа птиц в Европе с высокой смертностью как среди домашней птицы, так и среди диких птиц, поражением по меньшей мере 14 видов перелетных птиц, мигрирующих на большие расстояния.

Эта эпизоотия сопровождалась образованием необычно большого числа реассортантных вирусов, четыре из которых были найдены нами у диких и домашних птиц в России. Совместные международные сравнительные исследования выявленных нами Сибирских и Тувинских вирусов H5 позволили сформулировать гипотезу происхождения реассортантов и их распространения в западном направлении.

Очевидно, что необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение следующих аспектов:

1. Взаимосвязь между уровнем вирулентности вируса H5NX HPAI 2016/2017 и его приспособленностью в популяциях диких птиц (например, путем сравнительного экспериментального заражения);
2. Анализ миграционных паттернов, определение совпадающих районов размножения в Сибири у перелетных птиц, зимующих на больших расстояниях в Африке, Европе, Азии и Северной Америке (например, с помощью спутниковой телеметрии);

3. Анализ генетических характеристик вируса, физиологии хозяев и экологических условий, которые благоприятствуют образованию реассортантов между H5Nx HPAI и вирусами LPAI (например, путем экспериментального обмена генными сегментами между вирусами, полученными методами обратной генетики).

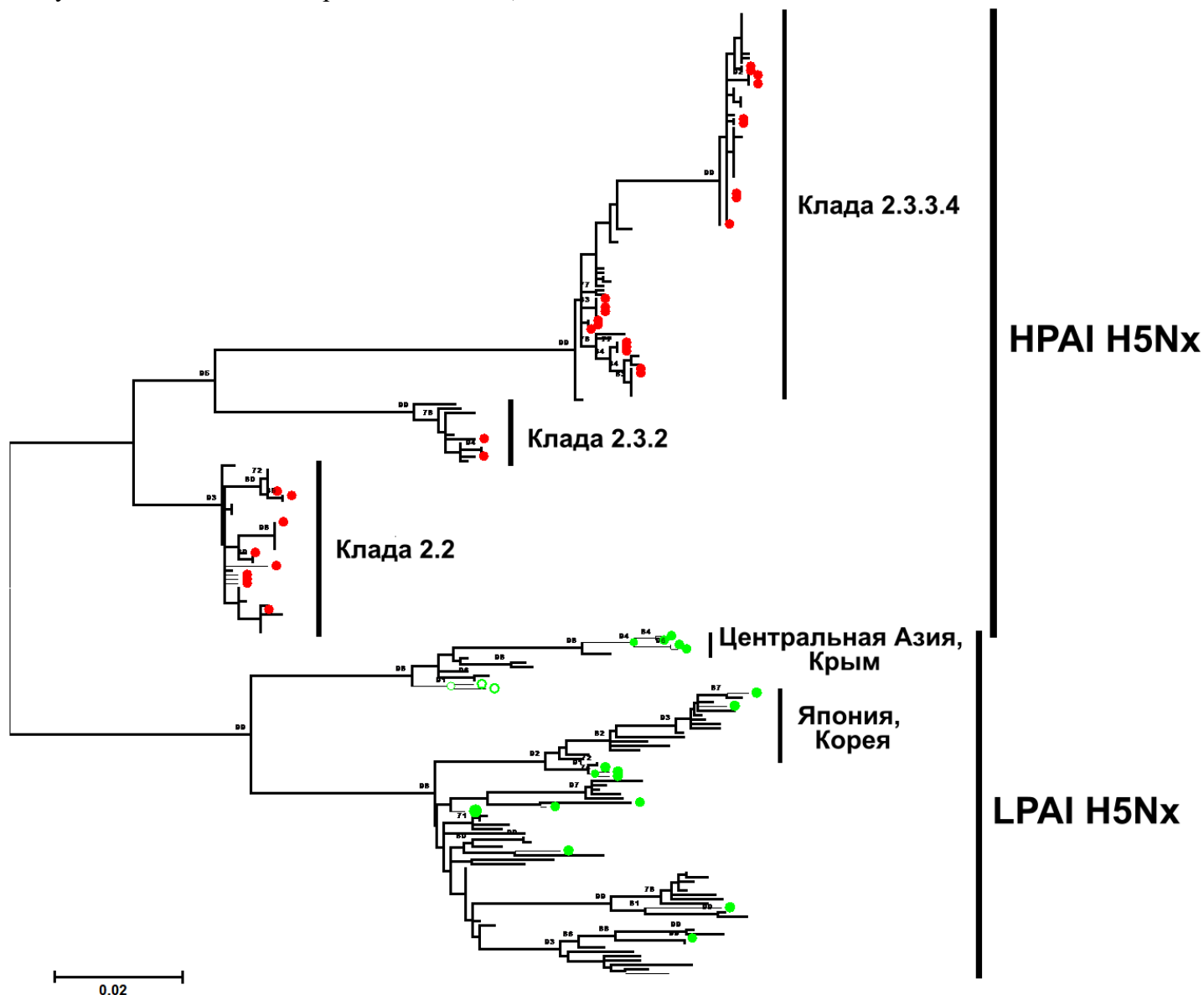


Рисунок 12 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома HA H5Nx вирусов гриппа, выделенных на азиатской части РФ в период 2005–2020 гг. Дерево построено методом максимального правдоподобия (MEGA5). Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (1000 шагов репликации), значения бутстрэп-статистики указаны слева от ветвей. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт.

Далее, нами был оценен вклад российских вирусов H5 в циркуляцию вирусов в Восточно-Азиатском регионе, в том числе в Японии в 2016–2018 гг. Работы проведены в рамках Российско-Японского консорциума, описанного в разделе 3.4.1. Наиболее важным было определить, существует ли связь между циркуляцией впервые обнаруженного в 2016 г. варианта H5 клада 2.3.4.4 HPAI из Сибири и последующим распространением вариантов, вызывающих эпизоотии на Дальнем Востоке, Японии.

Вспышка высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N6 (HPAI) произошла среди домашней птицы в Японии в январе 2018 г., также погибло несколько диких птиц в трех префектурах зимой 2017–2018 гг. Филогенетический анализ, измеренный во времени, показал, что гемагглютинин (HA) и гены внутренних белков этих изолятов были генетически сходны с

кладой 2.3.4.4.в H5N8 HPAI в Европе зимой 2016–2017 гг., а гены нейраминидазы (NA) изолятов домашней птицы и диких птиц были получены путем различных реассортаций с ВГА, которые, по оценкам, циркулировали возможно, в Сибири летом 2017 г. и летом 2016 г., соответственно (рисунок 13).

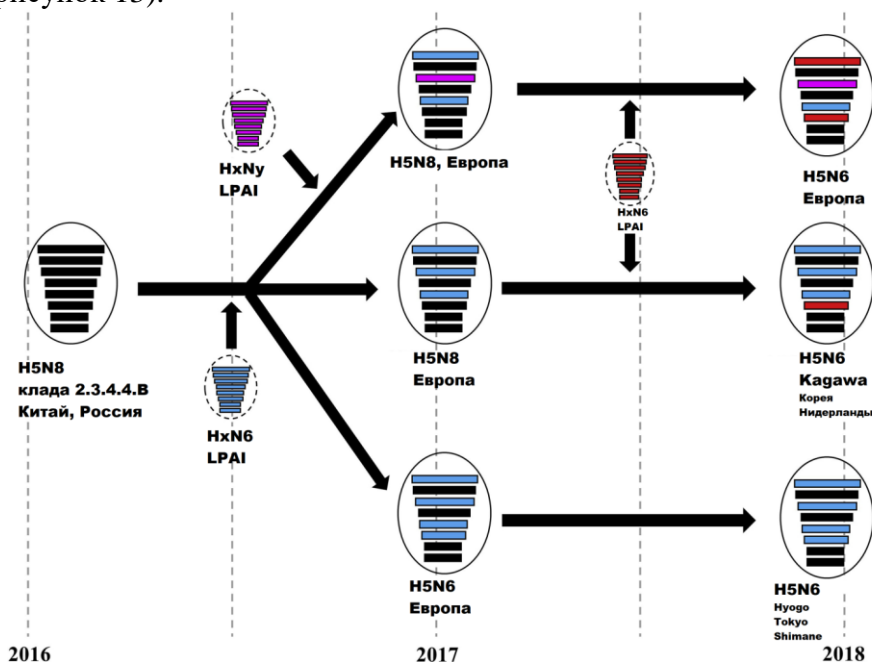


Рисунок 13 – Схема, иллюстрирующая эволюционную хронологию появления японского вируса H5N6 в результате реассортации между H5N8 HPAI и низкопатогенными вариантами вируса гриппа HxN6, HPAI циркулирующими в Евразии. Черные полосы обозначают вирус 2.3.4.4. В H5N8, выделенный во время эпизоотий на озерах Убсу-Нур и Цинхай в России и Китае в мае 2016 г.; другие цветные полосы обозначают происхождение от различных вариантов высоко- и низкопатогенных вариантов вируса.

Наши результаты показывают, что кллада 2.3.4.4 H5N6 HPAI, циркулировавшая в Японии в 2016–2017 гг., возникла в результате реассортации с совместно циркулирующими HPAI и низкопатогенными евразийскими вариантами диких птиц LPAI. Установлен факт, что гены PA японского вируса H5N6 HPAI произошли от трех различных источников вируса, циркулирующего среди диких птиц. Ранее сообщалось о случаях реассортации H5 HPAI азиатского происхождения с ВГА диких птиц для других клад H5 HPAI. В целом, мы филогенетически проанализировали 206 геномов вируса гриппа, выделенных нами в России и Японии в рамках Российско-Японского Консорциума, включая HPAI кллады 2.3.4.4 H5 и LPAI вирусы, изолированные в Японии и России. Наши результаты показывают, что, по меньшей мере, пять различных генотипов вируса H5N6 одновременно поражали домашнюю и дикую птицу в Японии зимой 2016–2017 гг. Японские вирусы H5N6 HPAI были получены из вируса H5N6, предположительно H5N6 HPAI, который циркулировал в Китае, в результате нескольких случаев реассортации с другими вирусами H5N6 HPAI или тремя различными линиями вируса (или с обоими). Наличие трех различных генов PA, происходящих от LPAI, у вирусов гриппа H5N6 подчеркивает важность эпиднадзора за вирусами гриппа у диких птиц для понимания того, где и как среди диких и домашних птиц образуются и распространяются новые HPAI, которые создают значительную экономическую нагрузку для птицеводческой отрасли и угрозу здравоохранению.

Вирусы H5N6 HPAI, распространившиеся в Японии среди домашних и диких птиц зимой 2017–2018 гг., также произошли в результате нескольких различных реассортаций между 2.3.4.4.В H5N8 HPAI и евразийскими низкопатогенными вирусами HxN6. Наиболее вероятно, что это могло произойти летом 2016 и 2017 гг. в Сибири, где контактируют перелетные птицы, зимующие в Азии или на Ближнем Востоке, а летом могут мигрировать в Европу для размножения. Обнаруженный нами факт того, что H5N6 HPAI вирусы с различными евразийскими генными сегментами проникли в Японию, подчеркивает важность понимания

циркуляции низкопатогенных вирусов в месте размножения в Сибири, где могут происходить реассортации, и выяснения того, как НРАІ распространяются по евразийскому континенту.

Таким образом, по результатам этой масштабной работы по исследованию распространения вируса на территории Дальнего Востока РФ и Японии можно сделать следующие основные заключения:

1. Вирусы гриппа H5N6 поражали домашних и диких птиц в Японии зимой 2016–2017 гг. и 2017–2018 гг. Гены NA японского штамма H5N6 относились к кладе 2.3.4.4.

2. Было очевидно существование трех различных варианта генов PA, происходящих от LPAI, у японских H5N6-HPAI.

3. Гены NS дальневосточного H5N6-HPAI произошли от двух различных китайских линий H5N6 вирусов домашних птиц.

4. Было обнаружено пять различных генотипов среди японских вирусов гриппа H5N6.

5. В ходе исследования была проанализирована филогеографическая динамика вирусов гриппа птиц с использованием сегмента гена NA N6.

6. Было подтверждено, что ВГА распространяются по всему миру по миграционным путям диких птиц, причем пересекающиеся миграции играют решающую роль в распространении на большие расстояния. В исследовании подчеркивается важность понимания перемещения перелетных птиц и динамики низкопатогенных вирусов гриппа в процессе размножения и миграции.

7. Это позволило предположить, что пересечение миграционных путей, например, в Монголии/Сибири и вдоль полуострова Аляска, способствовало распространению вируса гриппа на большие расстояния внутри Евразии и между Евразией и Северной Америкой.

Проведенный филогеографический анализ вирусов гриппа имеет и ряд ограничений, перспективных для проработки в будущем. В частности, нами отмечалось, что наиболее детально были проанализированы события реассортации с геном N6 NA, что, возможно, не учитывало фактические перемещения вирусов. Также необходим и более детальный анализ сегментов внутренних белков. В связи с этим крайне важно проводить дальнейший филогеографический анализ на основе полных геномов вируса гриппа различных субтипов, охватывая все доступные последовательности из баз данных.

Примечательно, что наше исследование показало, что генетически родственные высокопатогенные вирусы гриппа HPAI субтипа H5N6 вызывали вспышки одновременно в Европе и Восточной Азии. Это позволило предположить, что Монголия и Сибирь, возможно, сыграли определяющую роль в одновременных вспышках из-за своего положения на пересечении миграционных путей.

Наше исследование продемонстрировало важность филогеографического анализа для понимания перемещения вирусных штаммов и их потенциальной способности к реассортации. Оно подчеркнуло необходимость детальной идентификации видов-хозяев для тщательного изучения взаимосвязей между штаммами вируса и их хозяевами. Все эти моменты в совокупности подчеркивают важность понимания филогеографической динамики вирусов гриппа и их распространения по миграционным путям, а также важность рассмотрения ограничений и будущих направлений для более общего анализа.

2.8 Прикладные исследования вируса гриппа птиц. Практическое применение полученных научных результатов

1. На основе многолетнего мониторинга вируса гриппа у диких птиц (таблицы протоколов полевых и экспериментальных исследований) была сформирована база данных по экологии и распространенности вируса гриппа у диких птиц в азиатской части России, которая применялась для выявления процента вируса в любой из выборок, формируемой на основе таксономической и/или экологической принадлежности птиц, периода выделения, географического места выявления. Оформлена и зарегистрирована в установленном порядке пополняемая База данных «Распространенность вирусов гриппа А и авуловирусов у диких птиц в азиатской части России». (Св-во о гос. регистрации № 2022620256 от 17 января 2023 г.).

2. В результате многолетней работы нами была сформирована рабочая коллекция изолятов вирусов от диких птиц. Для большей части коллекции удалось определить субтип и последовательности нуклеотидных остатков генома. Изоляты, для которых были охарактеризованы основные биологические свойства, были паспортизованы и заложены на хранение в виде паспортизованных штаммов; 123 охарактеризованных штамма, обладающих уникальными характеристиками, была паспортизована и передана на патентное депонирование в три основные российские Государственные коллекции.:

3. Проведена оптимизация диагностики с использованием полученных штаммов. Наиболее актуальные штаммы коллекции, представляющие уникальные субтипы, антигенные или генетические группы были использованы в дальнейших прикладных исследованиях по созданию штаммов-продуцентов для последующего использования в разработках и оформлении РИД. В нашем исследовании для таких разработок была использована панель из 12 штаммов. На все 12 штаммов получены патенты РФ.

4. Проведена оптимизация диагностики с использованием разработанных нами олигонуклеотидов-праймеров. В результате данной работы было запатентовано два сета праймеров, чем существенно облегчается задача по мониторингу вируса гриппа. Были получены оригинальные результаты: часть нуклеотидных последовательностей опубликована в международных базах данных и использована для анализа генетического разнообразия вируса гриппа в азиатской части РФ и дифференциальной диагностики его от вируса болезни Ньюкасла. Получены патент РФ 2522822 «Синтетические олигонуклеотиды-праймеры, используемые для получения первичных последовательностей генов (PB2, PB1, PA, NP, MP, NS) низкопатогенных вирусов гриппа птиц» и патент РФ 2590718 «Набор олигонуклеотидов-праймеров для получения первичной структуры F гена вирусов болезни Ньюкасла класса 1».

5. Разработаны практические рекомендации по мониторингу вируса гриппа птиц. Фундаментальные данные по экологии и генетическому разнообразию вируса гриппа являются чрезвычайно важными для практической деятельности человека. Помимо оптимизированной системы мониторинга за высокопатогенным вирусом гриппа в азиатском регионе и оптимизации диагностики нами были подготовлены методические рекомендации для разработанной системы мониторинга вируса гриппа, а также лабораторный регламент на ее применение.

На основе полученных результатов разработаны МР «Комплексный мониторинг опасных для человека и животных вирусных инфекций в Центральной Азии (Россия, Китай)» и МР «Филогеографические исследования синантропных птиц в Центральной Азии (Россия, Китай) и использование их результатов для прогноза эпизоотической ситуации по гриппу»; Карта–схема ключевых точек исследований филогеографии диких птиц и проведения мониторинга вируса гриппа; лабораторный регламент на применение «Системы комплексного мониторинга опасных для человека и животных вирусных инфекций в Центральной Азии», проанализирован и оформлен актуальный список нормативной документации.

6. Проведено масштабное секвенирование геномов вируса гриппа и депонирование последовательностей в международные базы данных о генетическом разнообразии вирусов. Депонировано 267 последовательностей полных геномов. Для ряда штаммов удалось отсекуировать только некоторые сегменты. Общее количество депонированных последовательностей сегментов генома вируса гриппа составило 2318.

Результаты диссертационного исследования целесообразно использовать при разработке и внедрении новой системы оценки риска появления вирусов, опасных для человека и животных на территории России и Китая. Фундаментальные данные по циркуляции вируса гриппа в Азии и современной эволюционной динамике в популяциях хозяев, а также их коэволюции, необходимо использовать при разработке и внедрении мероприятий по оптимизации современных методов диагностики, профилактики и лечения на основе полученных оригинальных данных. Областью применения результатов является сфера контроля распространения вирусных инфекций, опасных для человека и животных, в частности на территории Азии (здравоохранение, ветеринария, обороноспособность государства, борьба с чрезвычайными ситуациями). Результаты могут быть использованы в специализированных высших учебных заведениях.

Социально-экономический эффект использования результатов можно получить в ходе дальнейшей реализации технологии, что позволит добиться улучшения качества жизни и здоровья населения путем эффективного применения системы комплексного мониторинга опасных для человека и животных вирусных инфекций в Центральной Азии, более эффективно применять меры по контролю инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных. Основным важным результатом является разработка системы по раннему обнаружению вспышек высокопатогенного гриппа птиц, по диагностике и прогнозу эпидемической или эпизоотической ситуации. Мониторинговые данные по циркуляции различных патогенов позволят своевременно выявить случаи их заноса на территорию России, принять превентивные противоэпизоотические меры и сделать адекватные прогнозы развития эпизоотической ситуации.

Таким образом, конечные результаты в дальнейшем могут быть использованы в научных целях, а также реализованы на практике для надзора и контроля опасных для человека и животных вирусных инфекций в азиатском регионе.

ВЫВОДЫ

1. В результате исследования биологических образцов, собранных на территории Северной Азии от 34835 особей диких птиц 269 видов, относящихся к 48 семействам и 20 отрядам, было выделено 549 изолятов вируса гриппа А (*Alphainfluenzavirus influenzae*). Установлена циркуляция вируса гриппа у 29 видов птиц из 7 семейств. Общая частота выявления вируса гриппа у всей исследованной выборки птиц (n=34835) составила 1,58%, а у видов птиц, вовлеченных в циркуляцию вируса (n=20648), — 2,66%. Для выборки птиц отряда гусеобразные (*Anseriformes*), вовлеченных в циркуляцию вируса гриппа, включающей 16 видов, частота выявления вируса в весенне-летний и осенне-зимний сезоны достоверно различалась и составила 0,34% (95% ДИ: 0,19–0,58) и 5,49% (95% ДИ: 5,01–6,01) соответственно. Среди этих видов наиболее высокие показатели выявления были зарегистрированы у широконоски (*Spatula clypeata*) и чирка-свистунка (*Anas crecca*) — 8,25% (95% ДИ: 6,08–10,93) и 7,09% (95% ДИ: 6,01–8,31) соответственно. Для выборки птиц семейства чайковых (*Laridae*) отряда ржанкообразных (*Charadriiformes*), включающей 6 видов, показатель выделения вируса был достоверно ниже и составил 0,5% (95% ДИ: 0,34–0,71). Впервые показано, что среди представителей отряда *Anseriformes* речные утки трибы *Anatini* (10 исследованных видов) имели достоверно более высокий показатель выделения вируса, чем нырковые утки трибы *Aythiini* (4 вида): 9,43% (95% ДИ: 5,86–7,04) против 0,87% (95% ДИ: 0,47–1,49). Исключение составила свиязь (*Mareca penelope*), у которой частота выявления была сопоставима с таковой у нырковых уток и составила 1,13% (95% ДИ: 0,23–3,31).
2. Установлена циркуляция 44 субтипов вируса гриппа. Среди них выявлены 12 достоверно ассоциированных комбинаций гемагглютинина и нейраминидазы: H1N1, H3N8, H4N6, H5N3, H8N4, H9N2, H10N7, H11N9, H12N5, H14N9, H15N4 и H16N3, что может свидетельствовать об устойчивости их фенотипа в природе. Эти же субтипы чаще всего встречались у диких птиц и характеризовались наибольшим числом субтипов поверхностных гликопротеинов и их комбинаций у представителей речных уток трибы *Anatini*. Впервые показана достоверная ассоциация с одним субтипом нейраминидазы NA для субтипов HA: H1(N1), H3(N8), H4(N6), H8(N4), H12(N5), H15(N4) и H16(N3). Напротив, для субтипов H2Nx, H5Nx, H6Nx, H7Nx и H10Nx не выявлено достоверной ассоциации с одной нейраминидазой при наибольшем разнообразии комбинаций.
3. На основании исследованной выборки птиц и выявленных вирусов впервые проанализирована ассоциация субтипов HA и NA с видом хозяина, географическим регионом и сезоном года на территории Северной Азии. Предложена концепция географической гетерогенности распространения вируса гриппа на территории Северной Азии и выделены ключевые территории его мониторинга у диких птиц. В частности, впервые выявлена достоверная ассоциация наиболее распространенных субтипов H3N8 и

H4N6 с территорией Западной Сибири и ее отсутствие для других регионов. Субтип H1N1 достоверно чаще ассоциирован с территорией Дальнего Востока. Показана достоверная ассоциация субтипа H6N6 с территорией Дальнего Востока; предложена гипотеза о его совместной циркуляции в популяциях диких птиц и домашних птиц Восточного Китая. Также выявлена ассоциация различных субтипов вируса гриппа с определенными видами хозяев. В частности, субтип H3N8 достоверно ассоциирован с чирком-трескунком и чирком-свистунком, но не имеет ассоциации с кряквой. Напротив, субтип H4N6 достоверно ассоциирован с кряквой и не ассоциирован с указанными видами чирков. Установлено, что вирусы субтипа H13Nx ($n = 11$), обнаруженные только у птиц семейства *Laridae*, для субтипа H13N6 были ассоциированы исключительно с чайкой тихоокеанской (*Larus schistisagus*), а для H13N2 — с сизой чайкой (*Larus canus*). Вирусы субтипа H11N8 были выявлены только у *Laridae*, а H11N9 — только у речных уток рода *Anas*.

4. Впервые предложена модель филогенетических паттернов всех восьми сегментов генома вируса гриппа, выделенных от диких и домашних птиц в 2007–2020 гг. на территории Северной Азии, на основе анализа 267 нуклеотидных последовательностей полных геномов. Панорамный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей сегментов внутренних белков (PA, PB1, PB2, NP, M и NS) выявил географически специфичные клады (дальневосточную, восточносибирскую/якутскую, западносибирскую/центральноазиатскую, западносибирскую/европейскую), субтип-специфичные клады (H5N1, H5N8, H6N6, H9N2) и видоспецифичные клады. При этом сегменты высокопатогенных вариантов H5N1 и H5N8 не образовывали отдельных географически или видоспецифичных филогенетических кладов, что может указывать на отсутствие общих предковых вирусов и предполагать события реассортации и различные пути заноса на территорию России. Установлена принадлежность вирусов из субтип-специфичных кладов H5N1, H5N8, H6N6 и H9N2 исключительно к аллелю А по сегменту NS, тогда как вирусы из всех географически специфичных кладов относились к обоим аллелям А и В.
5. Впервые обнаружена и описана специфическая филогенетическая кластеризация сегментов поверхностных гликопротеинов HA и NA: территориальная кластеризация для сегмента HA субтипов H3, H4 и H6 и сегмента NA субтипов N2, N6 и N8, а также хозяин-специфичная кластеризация для сегмента HA субтипов H11 и H13 и сегмента NA субтипов N2, N6 и N8. Для вирусов наиболее распространенного субтипа H3N8 показана принадлежность к классическим евразийским вирусам диких птиц (Classical Avian-like) с разделением на филогенетические субклады, характеризующиеся территориальной ассоциированностью: западносибирская, центральноазиатская и восточносибирско-дальневосточная. Исключение составил впервые установленный факт заноса штамма A/mallard/Russia_Prinozje/182/2019 (H3N8) на территорию российского Дальнего Востока из Северной Америки; для всех сегментов его генома показана принадлежность к североамериканским филогенетическим линиям. Для исследованных вирусов не установлено филогенетических связей с вирусами H3N8 субтипа млекопитающих и с зоонозными вариантами H3N8, вызывавшими заражение человека в Китае.
6. Впервые выявлены и описаны многочисленные случаи реассортации генома дальневосточных вирусов гриппа А разных субтипов, выделенных в 2017–2020 гг. и принадлежащих евразийской генетической линии, с вирусами североамериканской генетической линии, циркулировавшими в Канаде и США. В частности, для 20 выявленных на территории юга Дальнего Востока реассортантных вирусов гриппа птиц показано, что наиболее часто североамериканское происхождение имели сегменты NA (10 из 20) и M (6 из 20), реже — HA, NP и PB1 (2, 1 и 1 из 20 соответственно). Сегменты PA и PB2 североамериканского происхождения не обнаружены.
7. Впервые показано, что среди диких перелетных птиц на территории Дальнего Востока РФ одновременно коциркулируют две генетические группы вируса гриппа H6Nx. Первая представлена вирусами H6N1, H6N2 и H6N3, содержащими все сегменты генома классической евразийской линии вирусов диких птиц, а вторая включает штаммы H6N6, все сегменты генома которых идентичны генетическим вариантам вируса, эндемично

циркулирующим в популяциях домашних птиц Китая (Chinese poultry-like). Эти две филогенетические группы достоверно различаются антигенно, что подтверждено отсутствием кросс-реактивности в реакции торможения гемагглютинации. Впервые обнаружены вирусы с различными комбинациями сегментов этих двух генетических групп, а также сегментами NS и M североамериканского происхождения, что свидетельствует о событиях множественной реассортации.

8. Впервые в России обнаружены вирусы гриппа редких субтипов H12N2, H14N9 и H14N3, определены их основные вирусологические, антигенные и молекулярно-биологические свойства. Установлено, что штамм H12N2 является реассортантом, содержащим сегменты HA, NS и NP американской линии, а сегменты PA, PB1, PB2, MP и NA — классической евразийской линии вирусов гриппа птиц. Для сегмента HA вирусов H14Nx описана топология и предложена номенклатура, согласно которой все вирусы H14Nx относятся к двум базовым филогенетическим кластерам H14.1 и H14.2. Показано, что выделенные на территории Западной Сибири штаммы H14N9 и H14N3 относятся к субкладам H14.2.1a и H14.2.1b соответственно. Предложена гипотеза о формировании генетического разнообразия вируса H14Nx в Евразии и о наиболее вероятном времени дивергенции евразийской H14.2.1 и американской H14.2.2 линий вируса.
9. Установлена циркуляция низкопатогенных вариантов вируса гриппа H5N1, H5N2 и H5N3 субтипов, а также высокопатогенных вариантов H5N1, H5N2 и H5N8 субтипов на территории России в 2007–2020 гг.; определены их основные вирусологические и молекулярно-биологические свойства. Для низкопатогенных вирусов H5Nx впервые определена принадлежность к различным европейским, центральноазиатским и восточноазиатским субкладам и предложена их номенклатура. Для высокопатогенных вирусов H5Nx диких птиц определена принадлежность к кладам 2.2, 2.3.2, 2.3.2.1c и 2.3.4.4b; впервые показано, что активная циркуляция вирусов этих клад среди диких птиц в России последовательно сменяла друг друга в периоды 2005–2009, 2009–2011, 2014–2015 и 2016–2020 гг. соответственно. Впервые обнаружен высокопатогенный вирус гриппа H5N1 клады 7.1 у диких птиц на территории Центрального Китая (оз. Цинхай) в 2011 г.
10. Установлено, что на территории России во время беспрецедентной эпизоотии гриппа птиц 2016–2017 гг. циркулировали четыре из семи основных известных реассортантов вируса гриппа H5N8: SABAD8AA, CAEAF8AA, AAAAA8AA и AADAA8AA. Впервые на территории России был зарегистрирован генотип SABAD8AA, выделенный 10 июня 2016 г. на озере Убсу-Нур (Республика Тыва) во время эпизоотии среди диких птиц. Для этого реассортантного варианта показано, что сегменты HA, NA и NS принадлежали группе высокопатогенных вирусов H5N8 клады 2.3.4.4b, активно циркулирующей в Евразии с 2014 г., тогда как сегменты PB1, PB2, PA, NP и M принадлежали группе низкопатогенных вирусов диких птиц Евразии. Гемагглютинин HA имел характерный сайт протеолитического расщепления PLREKRRKR/G; вирус классифицирован как высоковирулентный для кур и мышей: индекс внутривенной патогенности составил от 2,5 до 2,84 у кур, а LD50 — 2,5–3,5 lg EID50/мл у мышей.
11. Установлен значимый вклад низкопатогенных вирусов различных субтипов и высокопатогенных вирусов H5Nx, циркулирующих в Сибири, в поток генов и события реассортации в Восточно-Азиатском регионе. Впервые показано, что высокопатогенные вирусы H5N6 клады 2.3.4.4, циркулировавшие в Японии в 2016–2017 гг., возникли в результате реассортации с совместно циркулирующими высокопатогенными китайскими и низкопатогенными евразийскими вариантами вирусов диких птиц и принадлежат к пяти реассортантным генотипам, наиболее вероятно, распространившимся в Японию из азиатской части России и Северного Китая. Вирусы H5N6, распространившиеся в Японии среди домашних и диких птиц зимой 2017–2018 гг., также произошли в результате нескольких событий реассортации вирусов H5N8 клады 2.3.4.4.b и имеют сегмент NA, происходящий от сибирских низкопатогенных вирусов HxN6. Установлено, что сегмент PA японского вируса H5N6 имел три различных по происхождению варианта, которые

циркулировали ранее в составе геномов низкопатогенных вирусов Северной Азии среди диких перелетных птиц.

12. Была оптимизирована работа по мониторингу вируса гриппа птиц: разработаны методические рекомендации и лабораторный регламент, предложена схема оптимизации секвенирования и дифференциальной ПЦР-диагностики, что подтверждено двумя патентами РФ. На основании результатов многолетнего мониторинга на территории Северной Азии сформирована и зарегистрирована база данных по экологии и распространенности вирусов гриппа у диких птиц; создана коллекция штаммов различных субтипов, из которых 123 штамма приняты на патентное депонирование в государственные коллекции вирусов Российской Федерации; в международные базы данных депонированы нуклеотидные последовательности 2318 сегментов генома вируса гриппа птиц. Созданная панель из 12 штаммов H1N1, H2N2, H5N1, H8N4, H10N5, H13N8, H15N4 и H16N3 (12 патентов РФ) апробирована и рекомендована для создания штаммов-продуцентов для диагностики и прикладных исследований.
13. Экологические особенности циркуляции, разнообразие и число субтипов, паттерны распределения сегментов генома исследованных вирусов гриппа по филогенетическим группам, а также выявленные случаи реассортации указывают на существенную роль гнездовых ареалов диких водоплавающих птиц Северной Азии в формировании биоразнообразия вируса гриппа А.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

КОЛЛЕКТИВНАЯ МОНОГРАФИЯ: Maria Alessandra De Marco, **Kirill Sharshov**, Marina Gulyaeva, Mauro Delogu, Lorenzo Ciccarese, Maria Rita Castrucci, Alexander Shestopalov. Ecology of Avian Influenza Viruses in Siberia. Chapter 4 (pp 83-160) in book «Siberia Ecology Diversity And Environmental Impact» Tabitha Robbins, editor. New York: Nova Publishers, [2016]. P.235.

СТАТЬИ

1. **Sharshov, K.** Molecular characterization and phylogenetics of a reassortant H13N8 influenza virus isolated from gulls in Mongolia / K. Sharshov, V. Marchenko, F. Yang, A. Alekseev, J. Cao, Z. Li, L.X. Li // *Virus Genes*. — 2014. — Vol.49. — P. 237-249.
2. **Sharshov, K.** Characterization and phylodynamics of reassortant H12Nx viruses in Northern Eurasia / K. Sharshov, J.Mine, I.Sobolev, O.Kurskaya, N.Dubovitskiy, M.Kabilov, T.Saito // *Microorganisms*. — 2019. — Vol.7, №12. — P. 643.
3. **Sharshov, K.A.** Avian influenza virus ecology in wild birds of Western Siberia / K.A.Sharshov, A.K. Yurlov, X. Li, W.Wang, L.Li, Y.Bi, A.M. Shestopalov // *Avian Research*. — 2017. — V.8. — P. 1-5.
4. **Sharshov, K.** Avian Influenza H5N1 Surveillance in Geese of Qinghai Province, China (2012) / K. Sharshov, V. Marchenko, F. Yang, A. Alekseev, J. Cao, Z. Li, L.X. Li // *Advances in Infectious Diseases*. — 2014. — Vol.4, №1. — P. 18-21.
5. **Sharshov, K.** First detection of a G1-like H9N2 virus in Russia, 2018 / K. Sharshov, O. Kurskaya, I. Sobolev, S. Leonov, M. Kabilov, A. Tatyana, A. Shestopalov // *Korean Journal of Veterinary Research*. — 2019. — Vol.59, №1. — P. 37-42.
6. Зайковская, А.В. Исключение этиологического значения вируса гриппа при массовой гибели диких птиц в Красноярском крае / А.В. Зайковская, С.Г.Сайфутдинова, В.Ю. Марченко, **К.А. Шаршов**, А.Г. Дурьманов, С.И. Золотых, Л.В.Шматова, П.М. Демчин, Ю.Г. Юшков, А.С. Донченко, В.А. Недужко, А.М.Шестопапов // *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. — 2011. — №1. — С. 84-89.
7. **Шаршов, К.А.** Молекулярно-биологические и антигенные особенности штаммов высокопатогенного вируса гриппа H5N1-субтипа, выделенных на юге Сибири в 2005-2009 гг / К.А. Шаршов, А.Г. Дурьманов, А.А. Романовская, А.В. Зайковская, В.Ю. Марченко, Н.Ю. Силко, Ф.А. Ильиных, И.М. Суслопаров, А.Ю. Алексеев // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2011. — № 5. — С.40-43.
8. Sivay, M.V. The role of wild goose (Anser) populations of Russia and the Tibet Plateau in the

- spread of the avian influenza virus / M.V. Sivay, N.Y. Silko, **K.A. Sharshov**, A.V. Prokudin, L.Li, M.Yang, A.M. Shestopalov // *Avian Research*. — 2011. — Vol.2, № 3. — P. 140-146.
9. Марченко, В.Ю. Характеристика вируса гриппа субтипа H5N1, выделенного во время вспышки среди диких птиц в России (Республика Тыва) в 2010 г / В.Ю. Марченко, **К.А. Шаршов**, Н.Ю. Силко, И.М. Суслопаров, А.Г. Дурьманов, А.В. Зайковская, А.Ю. Алексеев, О.В. Смолловская, А.П. Стефаненко, Е.М. Малкова, А.М. Шестопапов // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. — 2011. — № 4. — С. 36-40.
 10. Marchenko, V.Y. Ecology of influenza virus in wild bird populations in Central Asia / V.Y. Marchenko, A.Y. Alekseev, **K.A. Sharshov**, V.N. Petrov, N.Y. Silko, I.M. Susloparov, D. Tserennorov, D. Otgonbaatar, I.A. Savchenko, A.M. Shestopalov // *Avian diseases*. — 2012. — Vol.56, № 1. — P. 234-237.
 11. Прокудин, А.В. Результаты эпизоотологического мониторинга гриппа А на Таймыре в популяции гусеобразных рода *Anser* и *Branta* в 2005–2010 годах / А.В. Прокудин, К.А. Лайшев, **К.А. Шаршов**, А.Г. Дурьманов, А.М. Шестопапов // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. — 2012. — № 1 (13). — С. 40-44.
 12. Донченко, А.С. Генотипирование вирусов гриппа А, выделенных от диких птиц на юге Западной Сибири в 2011г / А.С. Донченко, Ю.Г. Юшков, М.В. Сивай, **К.А. Шаршов**, А.М. Шестопапов, М.А. Гуляева // *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки* — 2012. — № 6. — С. 84-89.
 13. **Шаршов, К.А.** Экология и эволюция высокопатогенного вируса гриппа H5N1 в России (2005-2012 гг.) / К.А. Шаршов, В.Ю. Марченко, А.К. Юрлов, А.М. Шестопапов // *Acta Biomedica Scientifica*. — 2012. — № 5-1 (87). — С. 393-396.
 14. Марченко, В.Ю. Экология вируса гриппа в популяциях диких птиц Центральной Азии / В.Ю. Марченко, **К.А. Шаршов**, А.М. Шестопапов // *Acta Biomedica Scientifica*. — 2012. — № 5-1 (87). — С. 271-275.
 15. Сайфутдинова, С.Г. Экология вируса гриппа у чаек Дальнего Востока России / С.Г. Сайфутдинова, **К.А. Шаршов**, Ю.Н. Герасимов, А.М. Шестопапов // *Acta Biomedica Scientifica*. — 2012. — № 5-1 (87). — С. 316-318.
 16. Сивай, М.В. Уникальные варианты вируса гриппа юга Западной Сибири / М.В. Сивай, А.К. Юрлов, А.В. Друзяка, **К.А. Шаршов**, А.М. Шестопапов // *Acta Biomedica Scientifica*. — 2012. — № 5-1 (87). — С. 319-322.
 17. Sivay, M.V. Surveillance of influenza A virus in wild birds in the Asian portion of Russia in 2008 / M.V. Sivay, S.G. Sayfutdinova, **K.A. Sharshov**, A.Y. Alekseev, A.K. Yurlov, J. Runstadler, A.M. Shestopalov // *Avian diseases*. — 2012. — V.56, № 3. — P. 456-463.
 18. Sivay, M.V. Influenza A (H15N4) Virus Isolation in Western Siberia, Russia / M.V. Sivay, T. Baranovich, V.Y. Marchenko, **K.A. Sharshov**, E.A. Govorkova, A.M. Shestopalov, R.J. Webby // *Journal of Virology*. — 2013. — Vol.87, № 6. — P. 3578-3582.
 19. Ilyicheva, T. Monitoring of influenza viruses in Western Siberia in 2008–2012 / T. Ilyicheva, I. Sobolev, I. Susloparov, O. Kurskaya, A. Durymanov, **K. Sharshov**, A. Shestopalov // *Infection, Genetics and Evolution*. — 2013. — V.20. — P. 177-187.
 20. Прокудин, А.В. Вирус гриппа А: серологические исследования желтков яиц диких птиц полуострова Таймыр в 2007-2012 гг. / А.В. Прокудин, К.А. Лайшев, **К.А. Шаршов**, А.Г. Дурьманов, А.М. Шестопапов // *Достижения науки и техники АПК*. — 2013. — № 11. — С. 48-50.
 21. Sivay, M.V. Avian influenza virus with hemagglutinin-neuraminidase combination H8N8, isolated in Russia / M.V. Sivay, **K.A. Sharshov**, M. Pantin-Jackwood, V.V. Muzyka, A.M. Shestopalov // *Genome Announcements*. — 2014. — Vol.2, № 3. — P. 10.1128.
 22. **Шаршов, К.А.** Оценка патогенного потенциала вируса гриппа А/H13N8, выделенного от серебристой чайки (*Larus argentatus*) / К.А. Шаршов, М.В. Сивай, В.Ю. Марченко, А.Ю. Алексеев, А.М. Шестопапов, В.А. Шкурупий // *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина* — 2014. — V.12, № 2. — P. 5-11.
 23. De Marco, M.A. Virological evaluation of avian influenza virus persistence in natural and anthropic ecosystems of Western Siberia (Novosibirsk Region, summer 2012) / M.A. De Marco, M. Delogu,

- M. Sivay, **K. Sharshov**, A.Yurlov, C. Cotti, A. Shestopalov // PLoS One. — 2014. — V.9, № 6. — P. e100859.
24. Sharshov, K. Neuropathological effect of clade 2.3.2 H5N1 influenza virus isolated from wild birds / K. Sharshov, E.Prokopyeva, I.Susloparov, W.Wang, Z.Li, L.Li, A. Shestopalov // Journal of Emerging Diseases and Virology. — 2015. — V.1. — P. 1-4.
 25. Соболев, И.А. Изменчивость вируса гриппа типа А / И.А. Соболев, О.Г. Курская, **К.А. Шаршов**, Е.А. Прокопьева, А.Ю. Алексеев, А.А. Гаджиев, А.М. Шестопалов //Юг России: экология, развитие. — 2016. — Т.11, № 1. — С. 170-177.
 26. Bi, Y. Highly pathogenic avian influenza H5N1 Clade 2.3.2.1c virus in migratory birds, 2014–2015 / Y .Bi, J. Chen, Z. Zhang, M. Li, T. Cai, **K.Sharshov**, I. Susloparov, A.Shestopalov, G. Wong, Y.He, Z. Xing, J.Sun, D. Liu, Y. Liu, L. Liu, W.Liu, F. Lei, W.Shi, G.F. Gao // Virologica sinica. — 2016. — Vol.31. — P. 300-305.
 27. Сивай, М.В. Вирус гриппа А в популяциях диких птиц юга Западной Сибири (2009-2010 гг.) / М.В. Сивай, **К.А. Шаршов**, А.В. Прокудин, К.А. Лайшев, А.М.Шестопалов // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. — 2016. — № 1 (29). — С. 38-44.
 28. Sobolev, I.A. Characterization of avian paramyxovirus type 6 isolated from a Eurasian teal in the intersection of migratory flyways in Russia / I.A.Sobolev, **K.Sharshov**, K.Yurchenko, D.Korneev, A. Glushchenko, T.Alikina, M.Kabilov, Y.Bi, W.Liu, N.Gubanova, A.Shestopalov // Arch Virol. — 2016. — Vol.161. — С. 3275-3279.
 29. Шестопалов, А.М. Итоги многолетнего (2006-2016 гг) мониторинга вируса гриппа А птиц на озере Убсу-Нур / А.М. Шестопалов, **К.А. Шаршов**, А.В. Варкентин, Ю.Г.Юшков, С.В. Леонов, И.В. Галкина, Т.П. Арчимаева, В.Н. Ирза, М.Ю. Щелканов, А.А. Гаджиев, М.З. Магомедова // Юг России: экология, развитие. — 2016. — № 3. — С. 106-119.
 30. Wang, W. The Evidence of Clade 7.1 Avian Influenza Virus (H5N1) in Qinghai Lake / W.Wang, **K.Sharshov**, Z.Li, S. Zheng, H.Sun, F.Yang, L.Li // Advances in Microbiology. — 2016. — Vol.6, № 14. — P. 1053.
 31. **Шаршов, К.А.** Экологическое разнообразие диких птиц – естественного резервуара вируса гриппа А на юге Западной Сибири / К.А. Шаршов, Л. Синьсинь, А.К. Юрлов, А.М. Шестопалов // Юг России: экология, развитие. — 2016. — № 4. — С. 56-65.
 32. Lee, D.H. Novel reassortant clade 2.3. 4.4 avian influenza A (H5N8) virus in wild aquatic birds, Russia, 2016 / D.H. Lee, **K.Sharshov**, D.E. Swayne, O.Kurskaya, I.Sobolev, M.Kabilov, A.Shestopalov // Emerging Infectious Diseases. — 2017. — Vol.23, № 2. — P.359.
 33. Prokopyeva, E.A. Pathogenicity assessment of wild-type and mouse-adapted influenza A (H1N1) pdm09 viruses in comparison with highly pathogenic influenza A (H5N1) virus / E.A. Prokopyeva, А.А. Romanovskaya, **К.А. Sharshov**, A.V. Zaykovskaya, A.Y.Alekseev, А.М. Shestopalov // Histology and Histopathology. — 2017. — Vol.32, №10. — P. 1057-1063.
 34. Takemae, N. Five distinct reassortants of H5N6 highly pathogenic avian influenza A viruses affected Japan during the winter of 2016–2017 / N. Takemae, R. Tsunekuni, **K.Sharshov**, T. Tanikawa, Y. Uchida, H. Ito, T. Saito, // Virology. — 2017. — Vol.512. — P. 8-20.
 35. Gulyaeva, M.A. The isolation of influenza a virus from plumage of waterfowl during autumn migration / M.A. Gulyaeva, **К.А. Sharshov**, I.A. Sobolev, A.K. Yurlov, A.A.Gadzhiev, N.I. Rabazanov, А.М. Shestopalov // South of Russia-Ecology Development. — 2018. — Vol.13, № 3. — P. 134-141.
 36. Gulyaeva, M. Characterization of avian-like influenza A (H4N6) virus isolated from Caspian seal in 2012 / M.Gulyaeva, I.Sobolev, **K.Sharshov**, O.Kurskaya, A.Alekseev, L.Shestopalova, A. Shestopalov // Virologica Sinica. — 2018. — V. 33. — P. 449-452.
 37. Korneev, D. Ultrastructural aspects of photodynamic inactivation of highly pathogenic avian H5N8 influenza virus / D. Korneev, O. Kurskaya, **K. Sharshov**, J.Eastwood, M.Strakhovskaya // Viruses. — 2019. — Vol.11, № 10. — P. 955.
 38. Prokopyeva, E.A. Pathology of A (H5N8) (Clade 2.3. 4.4) virus in experimentally infected chickens and mice / E.A. Prokopyeva, V.A. Zinserling, Y.C. Bae, Y. Kwon, O.G.Kurskaya, I.A.Sobolev, **К.А.Шаршов** // Interdisciplinary perspectives on infectious diseases. — 2019. — Vol.2019, №1. — P. 4124865.

39. Tsunekuni, R. Isolation of highly pathogenic H5N6 avian influenza virus in Southern Vietnam with genetic similarity to those infecting humans in China / R.Tsunekuni, K.Sudo, P.T. Nguyen, **K.A.Sharshov**, B.D. Luu, T.D. Phuong, T.M. Tan, T. Saito // *Transboundary and Emerging Diseases*. — 2019. — Vol. 2019, №6. — P. 2209-2217.
40. Mine, J. Phylogeographic evidence for the inter-and intracontinental dissemination of avian influenza viruses via migration flyways / J. Mine, Y. Uchida, **K.Sharshov**, I.Sobolev, A.Shestopalov, T.Saito // *PLoS One*. — 2019. — V.14, № 6. — P. e0218506.
41. Mine, J. Genetics and pathogenicity of H5N6 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from wild birds and a chicken in Japan during winter 2017–2018 / J.Mine, Y.Uchida, M.Nakayama, T.Tanikawa, R.Tsunekuni, **K.Sharshov**, T.Saito // *Virology*. — 2019. — Vol.533. — P. 1-11.
42. 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, С.С. Абдуллаев, Х.А. Ахмедрабаданов, **К.А. Шаршов** // *Юг России: экология, развитие*. — 2019. - № 1. С. 137-149.
43. Gulyaeva, M. Biological properties and genetic characterization of novel low pathogenic H7N3 avian influenza viruses isolated from mallard ducks in the Caspian region, Dagestan, Russia / M. Gulyaeva, M.A. De Marco, G. Kovalenko, **K. Sharshov**, E. Bortz, T.Murashkina, K. Yurchenko, A. Shestopalov // *Microorganisms*. — 2021. — Vol.9, № 4. — P. 864.
44. Sobolev, I. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Clade 2.3.4.4b, Western Siberia, Russia, 2020 / I. Sobolev, **K. Sharshov**, N. Dubovitskiy, O. Kurskaya, A. Alekseev, S. Leonov, Y. Yushkov, V. Irza, A. Komissarov, A. Fadeev, D. Danilenko, J.Mine, R. Tsunekuni, Y. Uchida, T. Saito, A. Shestopalov // *Emerging Infectious Diseases*. — 2021. — Vol.27, №8. — P. 2224.
45. Синьсинь, Л. Биологические свойства вируса гриппа H6N8-субтипа, выделенного от диких птиц на юге Западной Сибири / Л. Синьсинь, Н.А. Дубовицкий, А.В.Глушченко, И.А. Соболев, А.В. Друзьяка, М.М. Меджидова, Э.М. Мусинова, **К.А.Шаршов**, А.М. Шестопалов // *Юг России: экология, развитие*. — 2021. — № 1 (58). — С. 45-52.
46. Дёрко, А.А. Парамиксовирус птиц APMV-4, выделенный от кряквы обыкновенной (*Anas platyrhynchos*, Linnaeus, 1758): первый случай обнаружения в Западном Прикаспии/ А.А. Дёрко, Н.А. Дубовицкий, Т.А. Мурашкина, И.А. Соболев, М.В.Соломатина, А.Ю. Алексеев, М.Г. Магомедов, J.Mine, Y.Uchida, T.Saito, **К.А.Шаршов** // *Юг России: экология, развитие*. — 2021. — № 3 (60). — С. 81-87.
47. **Sharshov, K.** Avian Pathogens: Editorial and the Perspectives of Research / **K. Sharshov** // *Microorganisms*. — 2022. — Vol.10, №3. — P. 543.
48. Mine, J. Genetics of Japanese H5N8 high pathogenicity avian influenza viruses isolated in winter 2020–2021 and their genetic relationship with avian influenza viruses in Siberia / J. Mine, R. Tsunekuni, T. Tanikawa, Y. Uchida, N. Dubovitskiy, A. Derko, I. Sobolev, A. Shestopalov, **K. Sharshov**, T. Saito // *Transboundary and Emerging Diseases*. — 2022. — Vol.69, № 5. — P. e2195-e2213.
49. Gulyaeva, M. Monitoring of Potentially Emerging Pathogens in Wild Birds at Baikal Lake Basin in 2019 / M. Gulyaeva, E. Badmaeva, K.Yurchenko, **K. Sharshov**, I. Sobolev, Y.Bi, A. Shestopalov // *EcoHealth*. — 2022. — V.19, № 3. — P. 335-341.
50. Dubovitskiy, N. Virological and Genetic Characterization of the Unusual Avian Influenza H14Nx Viruses in the Northern Asia / N. Dubovitskiy, A. Derko, I. Sobolev, E.Prokopyeva, T. Murashkina, M. Solomatina, O. Kurskaya, A. Komissarov, A. Fadeev, D. Danilenko, P. Petrova, J. Mine, R. Tsunekuni, Y. Uchida, T. Saito, A. Shestopalov, **K.Sharshov** // *Viruses*. — 2023. — Vol.15, №3. — P. 734.
51. 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.
52. Xu, Y. The Novel 2.3.4.4 b H5N6 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses Isolated From Wild Birds in 2023 Posing a Potential Risk to Human Health / Y. Xu, J. Hu, C. Zhao, Y. Yuan, Z. Gao, **K. Sharshov**, Z. Wang, G. He // *Transboundary and Emerging Diseases*. — 2024. — Vol.2024(1) — P. 4900097.

Патенты РФ

1. **Пат. 2631938** Российская Федерация МПК C12N7/00, G01N33/569. Штамм вируса гриппа свиней A/SWINE/SIBERIA/1SW/2016H1N1-СУБТИПА для использования в диагностике вируса гриппа методами РТГА и ПЦР и исследования эффективности вакцин и противовирусных препаратов *in vitro* и *in vivo* / О.Г. Курская, **К.А. Шаршов**, А.Ю. Алексеев, И.А. Соболев, С.В. Леонов, Ю.Г. Юшков, А.М. Шестопапов; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (НИИЭКМ) (RU). – № 2016145025; заявл. 16.11.2016; опубл. 28.09.2017, Бюл. №28.
2. **Пат. 2451072** Российская Федерация МПК C12N7/00, A61K39/145. Штамм вируса гриппа A/Russia/01/2009-га субтипа H1N1 для изучения лечебной и профилактической эффективности противовирусных препаратов *in vitro* и *in vivo* / А.А. Романовская, **К.А. Шаршов**, А.В. Зайковская, А.Г. Дурыманов, А.М. Шестопапов; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" (ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор") (RU). – № 2010142478/10; заявл. 18.10.2010; опубл. 20.05.2012, Бюл. № 14.
3. **Пат. 2606030** Российская Федерация МПК C12N7/00, A61K39/145. Штамм вируса гриппа A/Common Muskrat/Chany Lake/226/05 H2N2-субтипа для использования в диагностике вируса гриппа методами РТГА и ПЦР и исследования эффективности противовирусных препаратов *in vitro* и *in vivo* / **К.А. Шаршов**, М.А. Гуляева, А.Ю. Алексеев, А.М. Шестопапов; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины" (НИИЭКМ) (RU). – № 2015155635; заявл. 24.12.2015; опубл. 10.01.2017, Бюл. № 1.
4. **Пат. 2366709** Российская Федерация МПК C12N7/00. Штамм вируса гриппа птиц A/Goose/Krasnoozerskoye/627/05 субтип H5N1 для изучения биологии вируса гриппа, лечебной и профилактической эффективности противовирусных препаратов / А.М. Шестопапов, А.В. Зайковская, А.Г. Дурыманов, С.И. Золотых, **К.А. Шаршов**, В.А. Евсеенко, Ю.Н. Рассадкин, И.Г. Дроздов; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU). – № 2008118903/13; заявл. 13.05.2008; опубл. 10.09.2009, Бюл. № 25.
5. **Пат. 2400536** Российская Федерация МПК C12N7/00. Штамм вируса гриппа птиц A/common gull/Chany/2006 H5N1 субтипа для приготовления антигенсодержащего диагностического или вакцинного препарата / **К.А. Шаршов**, О.Г. Курская, А.М. Шестопапов, А.В. Зайковская, А.Г. Дурыманов, Ю.Н. Рассадкин, И.Г. Дроздов; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU). – № 2009100655/10; заявл. 11.01.2009; опубл. 27.09.2010, Бюл. № 27.
6. **Пат. 2562856** Российская Федерация МПК C12N 7/00. Штамм вируса гриппа A/teal/Chany/444/09/ H8N8- субтипа для получения антигенсодержащего препарата, поликлональной сыворотки и применения в качестве контрольного референс-образца при оценке специфичности тест-систем на основе полимеразной цепной реакции / М.В. Сивай, **К.А. Шаршов**, А.М. Шестопапов, В.А. Шкурупий; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет" (Новосибирский государственный университет, НГУ), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины" (НИИЭКМ) (RU). –№ 2014135548/10; заявл. 01.09.2014; опубл. 10.09.2015, Бюл. № 25.
7. **Пат. 2522813** Российская Федерация МПК C12N7/00, G01N33/569. Штамм вируса гриппа A/rochard/Siberia/249/08-MA H10N7-субтипа для получения антигенсодержащего диагностического препарата и диагностической поликлональной сыворотки, применения в качестве контрольного референс-образца при оценке специфичности тест-систем на основе ПЦР и для изучения противовирусных препаратов *in vitro* и *in vivo* / **К.А. Шаршов**, С.Г. Сайфутдинова, В.Ю. Марченко, О.Г. Курская, А.Г. Дурыманов, А.М. Шестопапов; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет" (Новосибирский государственный университет, НГУ) (RU). – № 2013113398/10; заявл. 25.03.2013; опубл. 20.07.2014, Бюл. № 20.

8. **Пат. 2631932** Российская Федерация МПК C12N7/00. Штамм вируса гриппа A/blackheadedgull/Kamchatka/123/2013 H11N8-субтипа для использования в диагностике вируса гриппа методами РТГА и ПЦР и исследования эффективности противовирусных препаратов in vitro и in vivo / **К.А. Шаршов**, О.Г. Курская, Алексеев А.Ю., Соболев И.А., Шестопалов А.М.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины" (НИИЭКМ) (RU). – № 2016145023; заявл. 16.11.2016; опубл. 28.09.2017, Бюл. № 28.
9. **Пат. 2439149** Российская Федерация МПК C12N7/00, A61K39/145. Штамм вируса гриппа A/HERRING GULL/MONGOLIA/454/08/ H13N8-субтипа для получения диагностического антигенсодержащего субстрата и поликлональной сыворотки / В.Ю. Марченко, **К.А. Шаршов**, Ф.А. Ильиных, А.Г. Дурыманов, А.Ю. Алексеев, А.М. Шестопалов, О. ДАШДАВАА, Д. ЦЭРЭННОРОВ, Б. БЭХ-ОЧИР, ЯТАМСУРЫН Д.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU). – № 2010138219/10, заявл. 15.09.2010; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1.
10. **Пат. 2478705** Российская Федерация МПК C12N7/00, A61K39/145. Штамм вируса гриппа A/teal/Chany/7119/08/ H15N4-субтипа для приготовления антигенсодержащего диагностического препарата и получения диагностической поликлональной сыворотки для диагностических целей / М.В. Сивай, В.Ю. Марченко, А.Г. Дурыманов, **К.А. Шаршов**, А.М. Шестопалов; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" (ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор") (RU). – № 2012107189/10; заявл. 27.02.2012; опубл. 10.04.2013, Бюл. № 10.
11. **Пат. 2496872** Российская Федерация МПК C12N7/00, A61K39/145. Штамм вируса гриппа A/common gull/Altai/804/2011/H16N3 – субтипа для получения антигенсодержащего препарата, поликлональной сыворотки и применения в качестве контрольного референс-образца, при оценке специфичности тест-систем на основе полимеразной цепной реакции / **К.А. Шаршов**, М.В. Сивай, В.Ю. Марченко, О.В. Петрова, С.И. Золотых, А.Г. Дурыманов, А.М. Шестопалов; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет" (НГУ) (RU). – № 2012123090/10, заявл. 04.06.2012; опубл. 27.10.2013, Бюл. № 30.
12. **Пат. 2482184** Российская Федерация МПК C12N7/00, A61K39/17, G01N33/56. Штамм вируса болезни Ньюкасла для использования при серодиагностике болезни Ньюкасла в РТГА. Н.Ю. Силко, **К.А. Шаршов**, А.Г. Дурыманов, А.М. Шестопалов, Л.В. Шестопалова; заявитель и патентообладатель Силко, Шаршов К.А., Дурыманов А.Г., Шестопалов А.М., Шестопалова Л.В. – № 2010146027/10; заявл. 11.11.2010; опубл. 20.05.2012, Бюл. № 14.
13. **Пат. 2522822** Российская Федерация МПК C12N7/00, C12Q 1/68 Синтетические олигонуклеотиды-праймеры, используемые для получения первичных последовательностей генов (PB2, PB1, PA, NP, MP, NS) низкопатогенных вирусов гриппа птиц». Сивай, М. В., Шаршов, К. А., Прокопьева, Е. А., Дурыманов, А. Г., & Шестопалов, А. М. заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет" (НГУ) (RU).
14. **Пат. 2590718** Российская Федерация МПК C12N7/00, Набор олигонуклеотидов-праймеров для получения первичной структуры F гена вирусов болезни Ньюкасла класса 1. М.В. Сивай, **К.А. Шаршов**, К.С. Юрченко, В.А. Забелин, А.М. Шестопалов заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью "Витагор", Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет" (Новосибирский государственный университет, НГУ)
15. База данных «Распространенность вирусов гриппа А и авулавирозов у диких птиц в азиатской части России». (Свидетельство о гос. регистрации № 2022620256 от 17 января 2023 г.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю, научному консультанту д.б.н., профессору, заслуженному деятелю науки РФ Шестопалову Александру Михайловичу, который руководил работами с самого первого дня после окончания университета. Искреннюю благодарность и признательность автор выражает всему коллективу под его руководством, с которым работает на протяжении многих лет. Огромную неоценимую помощь в работе оказали к.б.н. А.Ю. Алексеев, к.м.н. О.Г. Курская, к.б.н. И.А. Соболев, А.А., к.б.н, Е.А. Прокопьева Дёрко, к.б.н. Т.А. Мурашкина., к.б.н. М.А. Гуляева, Е.А., к.б.н А.В. Глущенко, Л.С. Адаменко. Н.С. Касьянов, А.Г. Мархаев. Особую благодарность выражаю Дубовицкому Никите Артемьевичу за неоценимую помощь в статистической обработке и анализе представленности, биоинформатической обработке данных в среде R и построении карт. Автор искренне благодарит Резникову Марию Александровну за неоценимую помощь в техническом оформлении работы.

Выражаю искреннюю благодарность многочисленным участникам экспедиций по сбору биологического материала, включая Е.В. Шемякина, В.Ю. Габышева, М.В. Владимирцеву, И.М. Тиунова, П.С. Ктиторова, А.И. Мацыну, Ю.Н. Герасимова, Л.Д. Базарова, Е.Н. Бадмаеву, М.А. Андрияша, А.Г. Мархаева, О.Р. Друзяку, А.В. Друзяку, Ю.А. Щербакова, Ю.Н. Ирзу, А.В. Варкентина, В.Ю. Марченко, А.В. Прокудина, С.В. Леонова. Отдельную благодарность выражаю к.б.н. Юрлову Александру Константиновичу за многолетний вклад и помощь в мониторинге вируса гриппа.

Выражаю искреннюю благодарность всему коллективу отдела зоонозных инфекций и гриппа под руководством д.б.н. Шестопалова А.М., в котором осуществлялась работа над диссертацией в период с 2005 по 2013 гг. Отдельно выражаю искреннюю благодарность Дурыманову Александру Гавриловичу и д.б.н. Ильичевой Татьяне Николаевне за методическое содействие в реальной практической вирусологии и неоценимую помощь на протяжении всей работы над диссертацией.

Искренние благодарности всем неупомянутым многочисленным людям, принимавшим активное участие в исследованиях, на самых разных этапах работы.

Наконец, выражаю искреннюю благодарность и признательность своим родителям, биологам ИЦИГ СО РАН, к.б.н. Шаршову Александру Анатольевичу и Шаршовой Светлане Павловне за первое знакомство с биологической наукой и неоценимую помощь на протяжении всего времени работы над диссертацией!

Подписано в печать ##.##.2026. Бумага офсетная. Формат 60×84¹/₁₆.
Гарнитура Таймс. Усл. печ. л. 2,0

Тираж 100 экз. Заказ №.

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
