

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

*На правах рукописи*

***Марченко Василий Юрьевич***

**МОНИТОРИНГ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ  
НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

*1.5.10 – вирусология*

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант:

д.б.н., доцент. Т.Н. Ильичева

Кольцово, Новосибирская область – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список использованных сокращений	4
Общая характеристика работы	6
1. Обзор литературы	15
Введение	15
1.1 Вирусы гриппа А. Общие сведения.	16
1.1.1 Классификация.	16
1.1.2 Строение вириона и структура генома вируса гриппа А.	17
1.1.3 Жизненный цикл вируса гриппа А	19
1.2 Антигенный дрейф и антигенный сдвиг	25
1.3 Молекулярные маркеры, влияющие на биологические свойства вирусов гриппа птиц	33
1.4 История изучения вируса гриппа птиц	36
1.5 Экология вируса гриппа птиц	40
1.6 Основной хозяин вируса гриппа	43
1.7 Резервуар вируса гриппа птиц	47
1.8 Вирусы гриппа свиней	50
1.9 Распространение вирусов гриппа птиц	57
1.10 Высокопатогенный вирус гриппа птиц	60
1.10.1 Появление и распространение высокопатогенного вируса гриппа подтипа H5N1 (1996-2009)	61
1.10.2 Эволюция вирусов гриппа подтипа H5 (2009-2018)	64
1.10.3 Распространение вирусов клады 2.3.4.4	68
1.10.3.1 Вирус гриппа H5N5	68
1.10.3.2 Вирус гриппа H5N8	69
1.10.3.3 Вирус гриппа H5N6	72
1.10.3.4 Вирус гриппа H5N2	74
1.10.4 Распространение вируса гриппа подтипа H7N9	76
1.11 Стратегии борьбы с вирусами гриппа птиц	79
1.12 Исследования вируса гриппа птиц в России	83
1.13 Заключение по обзору литературы	85
2. Материалы и методы	87
2.1 Система мониторинга вируса гриппа птиц	87
2.2 Транспортировка и хранение биоматериала	89
2.3 Сбор биоматериала от птиц	90
2.4 Сбор биоматериала от свиней	92
2.5 Сбор биологического материала от людей	92

2.6	Культивирование вирусов гриппа в развивающихся куриных эмбрионах	94
2.7	Определение инфекционного титра вируса	95
2.8	Проведение реакции гемагглютинации и реакции торможения гемагглютинации	96
2.9	Проведение реакции нейтрализации	97
2.10	Определение чувствительности вирусов гриппа к противовирусным препаратам	97
2.11	Исследования на лабораторных животных	99
2.11.1	Определение вирулентности штаммов вируса гриппа на мышцах линии Balb/c	100
2.11.1	Получение поликлональных сывороток крови хорьков.	101
2.12	Постановка полимеразной цепной реакции	103
2.13	Пробоподготовка образцов и полногеномное секвенирование	105
2.14	Статистическая обработка результатов	110
3.	Результаты собственных исследований	111
3.1	Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2013 году	111
3.2	Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2014 году	114
3.3	Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2015 году	120
3.4	Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2016 году	128
3.5	Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2017 году	136
3.6	Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2018 году	148
3.6.1	Изучение вирусов гриппа подтипа H5Nx	152
3.6.2	Изучение вирусов гриппа подтипа H9N2	158
3.6.3	Изучение вирусов гриппа подтипа H3N2sw	161
3.7	Серологический мониторинг вируса гриппа птиц	166
3.8	Характеристика исследованной выборки диких птиц	173
4.	Обсуждение результатов исследований	183
5.	Выводы	203
6.	Список использованной литературы	204
7.	Приложения	270

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

HA	гемагглютинин вируса гриппа
HPAI	highly pathogenic avian influenza – высокопатогенный вирус гриппа птиц
LPAI	low pathogenic avian influenza – низкопатогенный вирус гриппа птиц
M1	матриксный белок вируса гриппа
MDCK	культура клеток почки взрослой самки кокер-спаниеля
NA	нейраминидаза
NP	нуклеопротеин
NS	неструктурный белок
PA	белок PA полимеразного комплекса (polymerase acidic protein)
PB1	белок PB1 полимеразного комплекса (polymerase basic protein 1)
PB2	белок PB2 полимеразного комплекса (polymerase basic protein 2)
а.о.	аминокислотный остаток
ВГА	вирус гриппа А
ВГП	Вирус гриппа птиц
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГАЕ	гемагглютинирующая единица
вРНК	вирионная РНК
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
дц ДНК	двуцепочечная ДНК
ИД <sub>50</sub>	50 %-ная инфицирующая доза
кДНК	ДНК, комплементарная вирусной РНК
кРНК	РНК, комплементарная геномной РНК
ЛД <sub>50</sub>	50 %-ная летальная доза
M2	белок ионного канала вируса гриппа
н.о.	нуклеотидное основание
НСО	Новосибирская область

о.е.	оптическая единица
ОРВИ	острая респираторная вирусная инфекция
ОТ	обратная транскрипция
п.н.	пара нуклеотидов
п.о.	пара нуклеотидных оснований
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РГА	реакция гемагглютинации
РКЭ	развивающиеся куриные эмбрионы
РНК	рибонуклеиновая кислота
РНП	рибонуклеопротеин
РТГА	реакция торможения гемагглютинации
ФСБ	фосфатно-солевой буфер
ЭИД <sub>50</sub>	50 %-ная эмбриональная инфицирующая доза

# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## АКТУАЛЬНОСТЬ РАБОТЫ

Вирусы гриппа относятся к семейству Orthomyxoviridae, которое включает четыре рода вирусов гриппа – А, В, С и D (F. Krammer et al., 2018). При этом, только вирусы гриппа А способны инфицировать широкий круг восприимчивых хозяев и представляют серьезную угрозу сельскому хозяйству и общественному здравоохранению. Вирусы гриппа А (ВГА) подразделяются на подтипы на основании антигенных различий в поверхностных гликопротеинах. На сегодняшний день известно 18 подтипов гемагглютинина и 11 подтипов нейраминидазы и большинство известных комбинаций сохраняется в популяциях диких птиц, которые, как известно, считаются основным природным резервуаром вируса гриппа А (S. Tong et al., 2012; S. Tong et al., 2013). При этом, основную роль в циркуляции вируса гриппа в природе играют птицы отрядов гусеобразные (*Anseriformes*) и ржанкообразные (*Charadriiformes*) (R.G. Webster et al., 1992; B. Olsen et al., 2006). Большинство видов птиц, принадлежащих к этим отрядам, являются дальними мигрантами, способными преодолевать значительные расстояния. Поскольку длительная адаптация вируса гриппа А к естественным хозяевам привела к возможности бессимптомного носительства, это создает предпосылки для глобального распространения данного инфекционного агента (S.W. Yoon et al., 2014). При этом, благодаря своим генетическим особенностям, вирус гриппа постоянно изменяется, приобретая уникальные мутации, которые способствуют не только распространению вируса гриппа, но и образованию генетических линий, клад и субклад, а также формированию различных вариантов вируса гриппа А (WHO, OIE, FAO, 2008). Так, в середине 1990-х годов в Юго-Восточной Азии начали формироваться очаги заболевания птиц, вызванного вирусом гриппа А/Н5N1, который обладал высокопатогенными свойствами. Штамм A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1) принято считать первым штаммом высокопатогенного вируса гриппа А/Н5

подтипа (X. Xu et al., 1999). Впоследствии, эволюция штамма привела к появлению и распространению различных его вариантов, таких как A/H5N1, A/H5N2, A/H5N3, A/H5N5, A/H5N6, A/H5N8, которые по сей день вызывают вспышки среди диких и домашних птиц, заболевания человека и других млекопитающих.

На 12.02.2021 Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) зарегистрировано 862 случая инфицирования человека вирусом гриппа A/H5N1, 455 из которых имели летальный исход. При этом, за период 2020 года новых случаев заражения человека вирусами A/H5N1 выявлено не было. Также, вызывают опасение случаи заражения людей вирусом гриппа A/H5N6. На 12.02.2021 известно о 30 лабораторно подтвержденных случаях, 16 из которых имели летальный исход. Помимо этого, на сегодняшний день имеется информация о 1568 случаях инфицирования людей вирусом гриппа A/H7N9. Стоит отметить, что продолжают регистрироваться случаи заражения человека вирусом гриппа A/H9N2. За 2020 год было зарегистрировано 5 новых случаев, общее число которых насчитывает 78 (С. Adlhoch et al., 2021).

На территории Российской Федерации вспышки, вызванные высокопатогенным вирусом гриппа птиц, регистрируются с 2005 года, когда на территории Западной Сибири была впервые в России зафиксирована гибель сельскохозяйственной птицы, вызванная вирусом гриппа H5N1 подтипа. Впоследствии вирус гриппа распространился в Европейскую часть России, вызвав беспрецедентную в то время эпизоотию, в результате которой были уничтожены миллионы голов сельскохозяйственной птицы.

Распространение высокопатогенных вариантов вируса гриппа и наносимый ими ущерб сельскому хозяйству и общественному здравоохранению является важной научной и социальной проблемой. С научной точки зрения особое внимание необходимо уделять эволюционным процессам и экологическим аспектам распространения высокопатогенных вариантов вируса гриппа. Одной из ключевых мер контроля за возбудителем является комплексный мониторинг высокопатогенного вируса гриппа в

местах наиболее вероятного контакта человека с основными хозяевами вируса гриппа птиц (ВГП), что позволит не только выявлять циркулирующие среди птиц и животных варианты ВГА, но и выяснить основные биологические свойства вируса, определяющие пандемический потенциал выделенных штаммов. Полученные в ходе такой работы данные позволят определить ключевые факторы, влияющие на пандемический потенциал циркулирующих вариантов вируса гриппа и оценить степень угрозы распространения этих вариантов среди населения.

В 2013 году Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека было принято решение о создании в Российской Федерации новой комплексной системы мониторинга вируса гриппа птиц. Система регламентировалась приказом Руководителя Роспотребнадзора от 30.09.2013г. № 714 «Об организации мониторинга за циркуляцией вирусов гриппа птиц». В рамках данного приказа мониторинг осуществлялся ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и 37 региональными учреждениями Роспотребнадзора – Центрами гигиены и эпидемиологии. Региональные учреждения Роспотребнадзора организовывали взаимодействие с местными лечебными учреждениями и ветеринарной службой, которые собирали первичный материал от людей и животных и направляли его для дифференциальной диагностики в региональный Центр гигиены и эпидемиологии. Все пробы, в которых обнаруживалась РНК вируса гриппа А, направляли в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора для изоляции вируса гриппа, углубленного изучения и оценки его пандемического потенциала.

## **ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Цель работы – проведение мониторинга высокопатогенного вируса гриппа птиц среди животных и населения на территории Российской Федерации.

Для выполнения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Совместно с региональными учреждениями Роспотребнадзора организовать и провести сбор биологического материала от животных и людей.
2. Провести исследования биологического материала на наличие вируса гриппа вирусологическими и молекулярно-генетическими методами.
3. Изучить биологические свойства наиболее важных в эпидемиологическом и эпизоотологическом значении вирусов гриппа.
4. Определить основные механизмы и пути распространения высокопатогенного вируса гриппа птиц на территории Российской Федерации.
5. Осуществить серологический мониторинг среди людей, по роду своей деятельности контактирующих с дикой и/или домашней птицей.
6. Охарактеризовать систему мониторинга Роспотребнадзора на основании проведенных многолетних исследований.

## **НАУЧНАЯ НОВИЗНА**

На территории Российской Федерации в течение шестилетнего периода (2013-2018гг) проведен комплексный мониторинг высокопатогенного вируса гриппа птиц. В процессе мониторинга: а) показана циркуляция различных вариантов вируса гриппа А, имеющих важное как эпизоотологическое, так и эпидемиологическое значение; б) создана коллекция из 144 актуальных штаммов вируса гриппа птиц различных субтипов, из которых 93 задепонированы в Государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

В ходе мониторинга высокопатогенного вируса гриппа птиц в 2014 году на территории республики Саха (Якутия) впервые на территории Российской

Федерации выявлен высокопатогенный вирус гриппа птиц подтипа А/Н5N8 клады 2.3.4.4а, который впоследствии распространился с дикими перелетными птицами в Европейские страны, где вызвал множественные вспышки среди диких и домашних птиц.

В ходе мониторинга 2016 года на территории республики Тыва был зарегистрирован повторный случай заноса вируса гриппа А/Н5N8 на территорию России. Было показано, что вирус гриппа подтипа А/Н5N8 клады 2.3.4.4b с дикими птицами распространился в Европейскую часть России, где вызвал масштабную эпизоотию среди диких и домашних птиц, которая продолжалась с 2016 по 2018 годы. За этот период на территориях Камчатского края и Саратовской области была впервые выявлена циркуляция вирусов гриппа А/Н5N5 клады 2.3.4.4b и А/Н5N6 клады 2.3.4.4h соответственно.

В 2018 году на территории Российской Федерации была зарегистрирована циркуляция трех различных генетических линий вирусов гриппа подтипа А/Н9N2.

## **ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ**

Полученные в ходе выполнения настоящей работы данные дополняют общую картину циркуляции вируса гриппа птиц в природе. Информация о биологических свойствах выделенных штаммов, а также данные об их хозяевах могут быть использованы при прогнозировании эпидемиологической и эпизоотологической ситуации.

Созданная в ходе работы коллекция актуальных штаммов вируса гриппа птиц и свиней может быть использована в диагностике и сравнительном изучении вновь выделяемых штаммов вируса гриппа

Опыт взаимодействия с региональными учреждениями Роспотребнадзора, а также учреждениями других ведомств в рамках мониторинга вируса гриппа птиц на территории Российской Федерации может

быть использован для осуществления мониторинга других зоонозных инфекций.

### **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ**

1. Система мониторинга Роспотребнадзора обеспечивает сбор и анализ биоматериала от людей и животных на значительной части Российской Федерации и является эффективным механизмом выявления и изучения циркулирующих вариантов вируса гриппа птиц в природе, в том числе его высокопатогенных вариантов.
2. Показано, что высокопатогенный вирус гриппа птиц подтипа А(Н5N8) клады 2.3.4.4 впервые был занесен с дикими птицами на территорию Российской Федерации в 2014 году и стал причиной масштабной эпизоотии, зарегистрированной в 2016-2018 гг.
3. В исследованный период (2013-2018 гг.) занос высокопатогенных и низкопатогенных вирусов гриппа на территорию Российской Федерации распространение осуществлялся дикими птицами из эндемичных очагов в странах Юго-Восточной Азии.
4. В исследованный период (2013-2018 гг.) на территории Российской Федерации не выявлено случаев циркуляции вирусов гриппа птиц среди людей. Вместе с тем, выявление в сыворотках крови людей антител к высокопатогенным вирусам подтипов Н5N8 и Н5N1 может свидетельствовать об инфицировании людей в предшествующий период циркуляции вирусов гриппа птиц.

### **АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ**

Результаты диссертационной работы были представлены на VI Региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии на Дальнем Востоке Российской Федерации» (Хабаровск, 2015), IX международной конференции «Options IX for the Control of Influenza» (Чикаго, США, 2016), III международной конференции молодых

ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (р.п. Кольцово, 2016), международной конференции «Trends in Influenza Research» (Санкт-Петербург, 2017), IX всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 2017), IV международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (р.п. Кольцово, 2017), II Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2017), V международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (р.п. Кольцово, 2018), X всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2018» (Москва, 2018), III Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2019), научно-практической конференции научного общества студентов и аспирантов биолого-технологического факультета НГАУ (Новосибирск, 2019), X международной конференции «Options X for the Control of Influenza» (Сингапур, 2019)

### **Публикации результатов исследований**

По материалам диссертационной работы опубликовано 25 печатных работ, в том числе 13 статей в изданиях, включенных в перечень ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук, а также 12 тезисов в сборниках трудов научных конференций.

### **Личный вклад автора в исследования**

Постановка задач, планирование экспериментов, анализ результатов, представленных в диссертационной работе, написание основополагающих научных трудов осуществлялись автором лично. Сбор биологического

материала, исследованного в данной работе, был осуществлен совместно с региональными учреждениями Роспотребнадзора – Центрами гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации. Автором лично проведено выделение изолятов вируса гриппа из первичного материала. При участии А.Г. Дурыманова, С.В. Святченко, А.С. Гудымо и Н.В. Данильченко изучены антигенные свойства выделенных изолятов, чувствительность вирусов гриппа А к противовирусным препаратам, а также проведена оценка вирулентности на лабораторных животных. При участии А.С. Гудымо и Н.В. Данильченко были получены поликлональные сыворотки крови хорьков, использованные в данной работе. Исследование сывороток крови людей на наличие антител к вирусам гриппа А в РТГА выполнено автором лично при участии А.С. Акимовой. При участии И.М. Сулопарова, Н.И. Гончаровой, Н.П. Колосовой проведено типирование и субтипирование выделенных изолятов методом ПЦР в режиме реального времени. Определение полных нуклеотидных последовательностей геномов штаммов вируса гриппа с помощью технологии секвенирования следующего поколения (NGS) на платформе Illumina выполнено автором при участии Т.В. Трегубчак. Биоинформационный анализ результатов секвенирования и последующий филогенетический анализ полученных данных выполнены автором при участии А.Н. Швалова, И.М. Сулопарова, Н.И. Гончаровой, А.В. Даниленко, Н.П. Колосовой. Все материалы, использованные в диссертационной работе, проанализированы и обобщены автором лично.

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному консультанту д.б.н., доценту Т.Н. Ильичевой за неоценимую помощь и советы при написании данной работы. Автор искренне признателен и благодарен заведующему отделом зоонозных инфекций и гриппа к.б.н. А.Б. Рыжикову за неоценимую помощь и поддержку в работе на всех ее этапах, в организации и проведении работ, представленных в диссертации. Автор искренне признателен и благодарен всем сотрудникам ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, внесшим свой вклад в проведение настоящего

исследования: А.Г. Дурыманову, С.В. Святченко, А.С. Гудымо и Н.В. Данильченко, А.С. Акимовой, к.б.н. И.М. Сулопарову, Н.И. Гончаровой, к.б.н. Н.П. Колосовой, Т.В. Трегубчак, к.в.-м.н. А.Н. Швалову, А.В. Даниленко, к.б.н. Е.В. Гавриловой, д.б.н. Р.А. Максютову.

Автор выражает благодарность руководству и сотрудникам региональных Управлений Роспотребнадзора, а также ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии» за неоценимый вклад при выполнении данной работы.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 275 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, список литературы, содержащий 482 работы отечественных и зарубежных авторов, приложения. Диссертация иллюстрирована 41 таблицей и 21 рисунком.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа А (ВГА), которые в настоящее время распространены повсеместно, представляют серьезную угрозу сельскому хозяйству и общественному здравоохранению. Данный тип вирусов имеет широкий круг хозяев, включая большое количество видов птиц и млекопитающих. Экология и эпидемиология вирусов гриппа А являются очень сложными. В этих процессах, помимо людей, участвуют различные как свободно живущие дикие, так и выращенные в неволе дикие и домашние птицы, а также различные виды млекопитающих: свиней, лошадей, собак, летучих мышей. Помимо этого, регистрируются спорадические случаи инфекции у прочих видов млекопитающих.

Другой ключевой характеристикой вируса является генетическая и антигенная изменчивость, возникающая в результате сочетания высокой частоты мутаций и сегментированного генома, который обеспечивает возможность быстрого изменения и адаптации к новым хозяевам. В определенных условиях ВГА может адаптироваться к новому хозяину, в результате чего он эффективно реплицируется, распространяется и становится эндемичным для определенного вида. При этом, в результате процесса адаптации появляется вирусная линия, которая имеет определенную хозяйскую специфичность, так что впоследствии вероятность проникновения данной линии вирусов в популяции других видов снижается. Например, вирус, который становится эндемическим у лошадей, становится менее заразным для других видов, таких как свиньи или люди. Более простое преодоление видового барьера наблюдается у вирусов различных видов птиц. Так, адаптированный к курице вирус, как правило, способен заражать другие виды курообразных (*Galliformes*), при этом, другие классы птиц, такие как утки или голуби, могут быть устойчивы к инфекции. ВГА могут вызывать широкий спектр клинических заболеваний, которые обычно связаны с патогенезом гриппа, независимо от того, поражает ли вирус только эпителиальные клетки

слизистой оболочки или вызывает системную инфекцию. В связи с этим, для контроля распространения ВГА среди животных используются различные инструменты, включая вакцинацию, карантин и даже выбраковку зараженных животных. В некоторых случаях ликвидация вируса в восприимчивой популяции может быть достигнута, но зачастую это влечет существенные экономические затраты. Во многих странах ВГА являются эндемичными, и усилия по их контролю, главным образом, направлены на снижение экономических потерь. Поскольку первичным резервуаром для ВГА являются дикие птицы, конечная цель полного уничтожения вируса гриппа не достижима, а возможность появления новых и уникальных вирусов из резервуара диких птиц является постоянной угрозой.

## **1.1 Вирусы гриппа А. Общие сведения**

### **1.1.1 Классификация**

Вирус гриппа А (ВГА) принадлежит к семейству РНК-вирусов с сегментированным геномом *Orthomyxoviridae*, которое в настоящее время включает семь различных родов, принятых Международным комитетом по таксономии вирусов. Данное семейство включает вирусы гриппа А, В, С, D, роды *Isavirus*, *Thogotovirus* и *Quarantivirus* (ICTV, 2020).

Вирусы гриппа А являются наиболее распространенными и важными членами своей таксономической группы, благодаря способности заражать значительное количество различных видов птиц и млекопитающих (рис. 1) (С. Sreenivasan et al., 2019). Вирусы гриппа типов В и С – это патогены человека, которые редко заражают другие виды, хотя сообщалось о заражении свиней и тюленей (А. D. Osterhaus et al., 2000). Вирус гриппа D способен вызывать респираторные заболевания у свиней и крупного рогатого скота (В.М. Hause et al., 2014; Е. А. Collin et al., 2015).

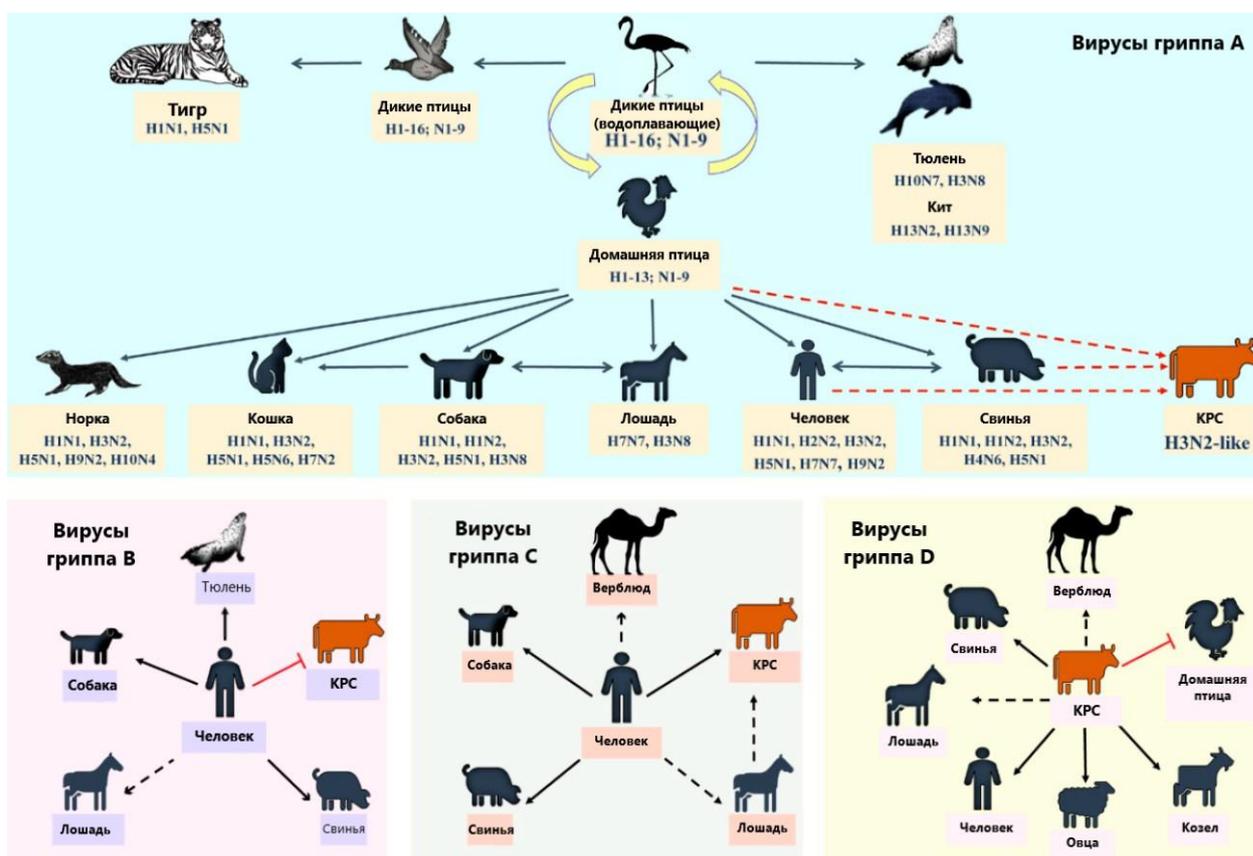


Рисунок 1. Распространение вирусов гриппа среди различных видов (С. С. Sreenivasan et al., 2019).

### 1.1.2 Строение вириона и структура генома вируса гриппа А

ВГА могут быть морфологически разнообразными, начиная от сферических частиц диаметром 80–120 нм и заканчивая нитевидными формами, длина которых может составлять несколько микрометров. Нитевидные формы, зачастую, преобладают в клинических образцах, но после культивирования в клеточной культуре или развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) вирус часто приобретает сферическую форму. Это показано, по крайней мере, для вирусов гриппа человека (S. V. Bourmakina, A. Garcia-Sastre, 2003; M. L. Shaw, P. Palese. 2013).

Вирион вируса гриппа А состоит из двухслойной липидной оболочки с радиально расположенными на ней «шипами» гликопротеинов гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА), белка ионного канала М2 и нуклеокапсида, в котором находятся 8 сегментов одноцепочечной

антисмысловой РНК. (F. Krammer et al., 2018) (Рис. 2). Гемагглютинин представлен в виде тримера, который появляется в виде шипов на липидной мембране, и является наиболее распространенным поверхностным белком. Белок нейраминидазы существует в виде тетрамеров (A. Gaymard et al., 2016).

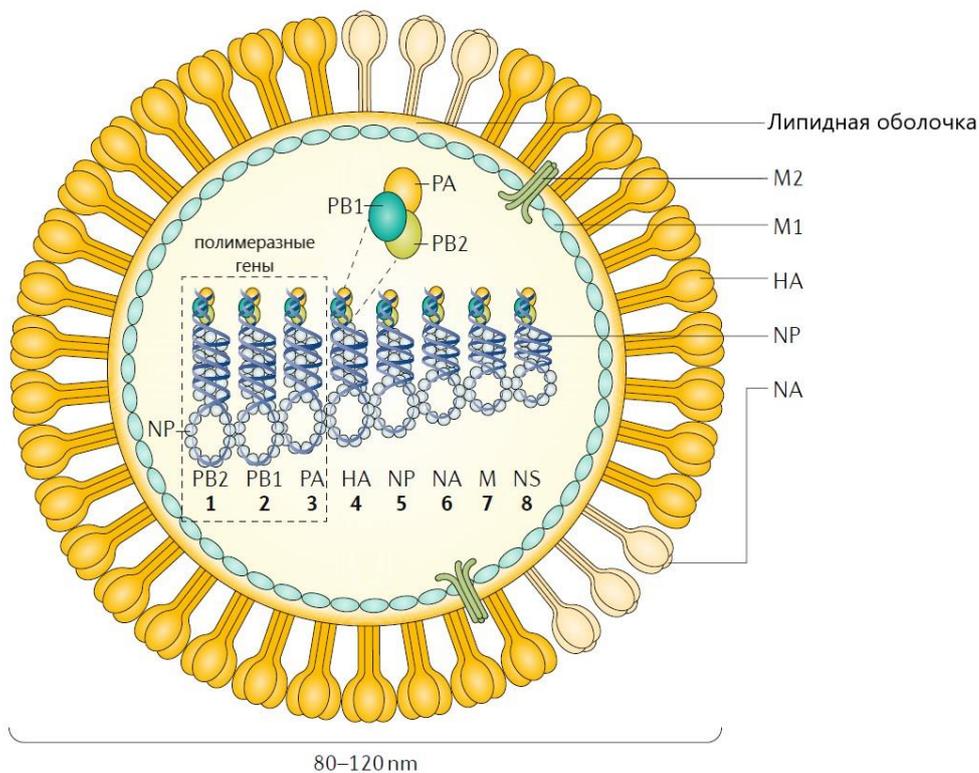


Рисунок 2. Строение вириона вируса гриппа А (F. Krammer et al., 2018)

Все ВГА имеют 8 сегментов генома, которые кодируют, по меньшей мере, 12 различных вирусных белков. Структурные белки в зрелом вирионе могут быть разделены на поверхностные белки, которые включают гемагглютинин (HA), нейраминидазу (NA) и мембранный ионный канал (M2). Внутренние белки включают нуклеопротеин (NP), матричный белок (M1) и белки полимеразного комплекса, состоящего из белка полимеразы 1 (PB1), белка полимеразы 2 (PB2) и белка полимеразы (PA) (P. Palese, M. L. Shaw, 2007). Два дополнительных белка, продуцируемых ВГА, изначально назывались неструктурными белками, а именно неструктурный белок 1 (NS1) и неструктурный белок 2 (NS2). Белки были названы неструктурными ввиду того, что они не обнаруживались в вирусной частице, но вырабатывались в больших количествах в клетке хозяина – NS1 преимущественно в ядре, NS2 –

в цитоплазме (I. Birch-Machin et al., 1997; T. Tumpey et al., 2005). Позже стало известно, что белок NS2 все же присутствует в очищенном вирионе и взаимодействует с матриксным белком (M1) (Richardson and Akkina, 1991; M. L. Shaw, P. Palese, 2013). В настоящее время он известен как ядерный экспортный белок (NEP) (R. O'Neill et al., 1998). Несколько дополнительных вспомогательных белков появляются в результате транскрипции с альтернативных открытых рамок считывания, хотя функция многих из них плохо изучена (A. V. Vasin et al., 2014). Белок PB1-F2, белок из 87 аминокислотных остатков, который транскрибируется с другой рамки считывания, с гена белка PB1, является потенциальным фактором вирулентности, который, как считается, участвует в апоптозе клеток хозяина, но он обнаружен не во всех ВГА (W. Chen et al., 2001). Было показано, что белок PA-X, продукт сдвига рибосомного каркаса, снижает иммунный ответ у мышей (B. W. Jagger et al., 2012). Роль и значение этих вспомогательных белков все еще изучаются, и их важность для патогенеза гриппа неизвестна.

Белок HA подразделяется на 18 различных подтипов, которые первоначально разделялись по результатам реакции торможения гемагглютинации (РТГА), а сейчас подтверждаются секвенированием и анализом генов. Различные подтипы неравномерно распределены среди различных видов птиц и млекопитающих, но наибольшее разнообразие ВГА встречается в классе *Aves*. Разнообразие подтипов ВГА намного меньше у млекопитающих. Оно ограничено несколькими подтипами HA, являющимися эндемичными или вызывающими спорадические инфекции млекопитающих.

### **1.1.3 Жизненный цикл вируса гриппа А**

Начальным этапом инфицирования ВГА является присоединение вирусного белка гемагглютинина к сиаловой кислоте рецептора клетки-хозяина. Вирус проникает в клетку путем эндоцитоза (W.I. Weis et al., 1988). Сиаловая кислота является общим термином для терминальных сахаров, обнаруженных в N- и O- связанных гликопротеинах, которые могут быть

получены из многих производных нейраминовой кислоты. Молекулы сиаловой кислоты часто классифицируются с точки зрения того, как они связаны с основными сахарами в  $\alpha$ -2 углеводе. Наиболее распространенными являются связи  $\alpha$ -2,3 и  $\alpha$ -2,6 (Y. Suzuki, 2005). Эти связи сиаловых кислот приводят к различным конформациям белка-рецептора хозяина, который влияет на связывание с вирусом. Белок гемагглютинаина связывается с различными типами сиаловых кислот с разной степенью аффинности, которая зависит от преобладания тех или иных аминокислот, от чего, в свою очередь зависит способность вируса инициировать процесс инфекции. Вирус должен достаточно сильно связываться с белком клетки хозяина, чтобы начался процесс эндоцитоза, и, как правило, наблюдается высокая специфичность вируса в отношении связи  $\alpha$ -2,3 или  $\alpha$ -2,6. Разные виды животных имеют разные уровни экспрессии сиаловых кислот  $\alpha$ -2,3 и  $\alpha$ -2,6, которые могут различаться в разных тканях одного и того же животного. Сиаловая кислота  $\alpha$ -2,3 преимущественно экспрессируется у различных видов птиц, а сиаловая кислота  $\alpha$ -2,6 экспрессируется в верхних дыхательных путях человека (рис. 3).

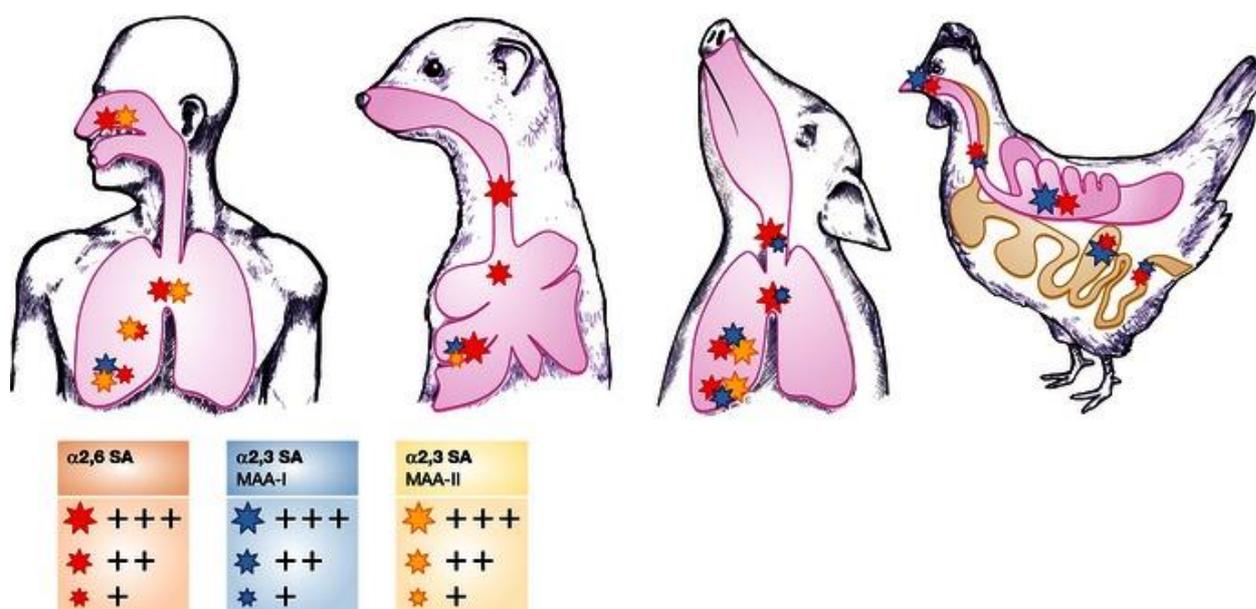


Рисунок 3. Распределение  $\alpha$ -2,6 и  $\alpha$ -2,3 сиаловых кислот на поверхности эпителия респираторного тракта человека и животных (M. de Graaf, R.A. Fouchier, 2014)

Считается, что специфичность в связывании гемагглютинина является одним из факторов, определяющих видовой барьер вируса гриппа. Хотя данные свидетельствуют о важной роли рецепторной специфичности в связывании с сиаловой кислотой, некоторые виды, включая человека, перепелов и свиней, экспрессируют оба типа сиаловых кислот, хотя с различным распределением в тканях (C. I. Thompson et al., 2006; H. Wan, D. R. Perez, 2006). Такое распределение рецепторов может напрямую влиять на патогенез, как это было показано при инфекции H5N1 у людей, при которой обычно наблюдается пневмония, а не инфекция верхних дыхательных путей. Патологический процесс, по-видимому, коррелирует с экспрессией  $\alpha$ -2,3 сиаловой кислоты в альвеолярных пневмоцитах 2-го типа в легких (K. Shinya et al., 2006). Дополнительным фактором является то, что рецепторная специфичность гемагглютинина к сиаловой кислоте любого типа не является абсолютной, и некоторые вирусы могут связываться как с  $\alpha$ -2,3, так и с  $\alpha$ -2,6-сиаловыми кислотами (S. Yamada et al., 2006). В экспериментальных исследованиях было показано, что у людей и животных часто могут реплицироваться вирусы с различной рецепторной специфичностью, если субъекты получают достаточно большую заражающую дозу (A. S. Beare, R. G. Webster, 1991; V. S. Hinshaw et al., 1981). Специфичность гемагглютинина к сиаловой кислоте может изменяться с помощью всего лишь двух аминокислотных замен в положениях 226 и 228 (нумерация аминокислот H3) (R. J. Connor et al., 1994; A. Vines et al., 1998). В исследованиях *in vivo* документирован ряд случаев возникновения аминокислотных замен при пассировании вируса гриппа в разных системах выделения или непосредственно в организме хозяина (M. J. Pantin-Jackwood et al., 2014; J. Stevens et al., 2010). Ранее предполагалось, что свиньи являются своеобразным сосудом, в котором могут смешаться вирусы гриппа человека и вирусы гриппа птиц, в связи с тем, что на эпителии респираторного тракта свиней наблюдается высокий уровень экспрессии как  $\alpha$ -2,3, так и  $\alpha$ -2,6-сиаловых кислот. Данная теория заключалась в том, что свиньи могут быть

одновременно инфицированы вирусами гриппа человека и вирусами гриппа птиц, и между этими вирусами может произойти реассортация, которая может привести к появлению нового штамма ВГА, обладающего пандемическим потенциалом (С. Scholtissek et al., 1985; R. G. Webster et al., 1997). Гипотеза о том, что свинья является сосудом для смешивания различных ВГА, подтверждается некоторыми исследованиями, в которых описаны случаи выделения от свиней различных реассортантов ВГА (А. I. Karasin et al., 2000; К. Van Reeth, 2007). Так, пандемический ВГА H1N1 2009 года, вероятно, был реассортантом между двумя разными вирусами гриппа свиней, однако нет информации о том, где и когда произошла данная реассортация (G. J. Smith et al., 2009). Тем не менее, случаи инфицирования людей вирусами гриппа птиц (H5N1, H9N2, H7N7, H7N3 и H7N9), которые так и не стали пандемическими, показывают, что основным фактором риска заражения человека является контакт с инфицированной домашней птицей, а не свиноводство (М. Koopmans et al., 2004; М. Peiris et al., 1999; D. L. Suarez et al., 1998; S. A. Tweed et al., 2004; P. Wu et al., 2014).

Адсорбция вируса на поверхности клетки происходит в результате взаимодействия рецептор-связывающего сайта гемагглютинина с остатками сиаловых кислот, присутствующих на поверхностных гликопротеинах или гликолипидах клетки (W.I. Weis et al., 1988). Вирус проникает в клетку путем эндоцитоза. Ионные каналы, образованные белком М2, пропускают поток  $H^+$  ионов из эндосомы внутрь вириона, что приводит к разрушению связей между белком М1 и рибонуклеиновыми комплексами (А. J. Hay, 1992; А. Helenius, 1992; R.A. Lamb et al., 1994). Низкое значение рН эндосомы индуцирует конформационное изменение гемагглютинина, приводящее к слиянию вирусной и эндосомальной мембраны (P.A. Bullough et al., 1994). В результате рибонуклеопротеиновые комплексы высвобождаются в цитоплазму, а затем мигрируют в ядро клетки через ядерные поры (рис. 4).

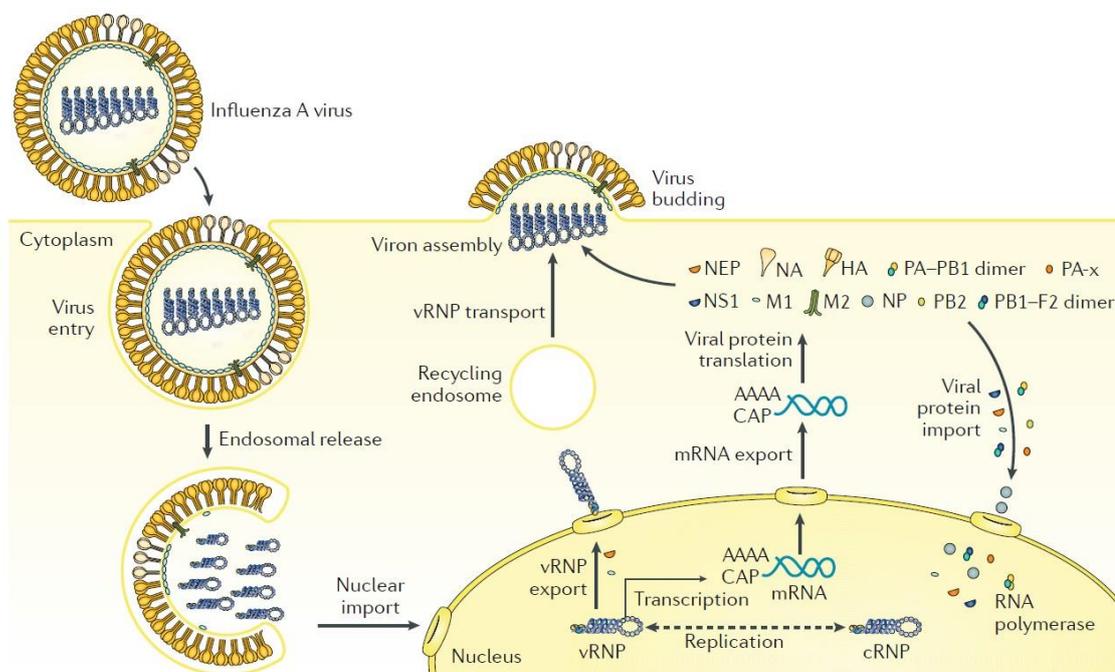


Рисунок 4. Цикл репродукции вируса гриппа А (F. Krammer et al., 2018)

В ядре происходит репликация генома вируса и синтез вирусных мРНК при помощи вирусной РНК-зависимой-РНК-полимеразы, которая состоит из субъединиц PB2, PB1 и PA (G.L. Smith, 1982; G.I. Shapiro et al., 1987; G.I. Shapiro, 1988).

Для инициации синтеза вирусной мРНК требуется праймер, представляющий собой кэп-содержащий фрагмент РНК длиной 10-13 нуклеотидов, который отщепляется от клеточной мРНК вирусной полимеразой по пуриновому остатку (S.J. Plotch et al., 1981). Связывание G-остатка на 3'-конце кэп-содержащего праймера с предпоследним C-остатком сегмента vРНК инициирует транскрипцию вирусной мРНК (M. Bouloy et al., 1978; M. Bouloy et al., 1979; R.M. Krug et al., 1979; S.J. Plotch et al., 1979; C. Herz et al., 1981; S.J. Plotch et al., 1981). Элонгация мРНК происходит до участка (расположенного в 15-22 н.о. от 5'-конца гРНК), содержащего подряд несколько U-остатков, после чего синтез terminates повторяющимся копированием этого участка (полиаденилированием мРНК) (A.J. Hay et al., 1977 (a); J.S. Robertson et al., 1981).

В клетках, инфицированных вирусом гриппа А, два типа полноразмерных вирусных мРНК, кодирующих белки NS1 и М1, подвергаются сплайсингу в ядре с образованием мРНК, кодирующих белки NS2 и М2, соответственно. При этом вирус использует сплайсинговый аппарат клетки-хозяина. Сплайсированные и несплайсированные вирусные мРНК мигрируют в цитоплазму (R.M. Krug et al., 1989).

Репликация гРНК вируса происходит в два этапа: 1) синтез кРНК – комплементарной копии гРНК и 2) синтез гРНК в результате копирования кРНК (R.M. Krug et al., 1989). Транскрипция кРНК отличается от транскрипции вирусных мРНК отсутствием праймирования при инициации синтеза и предотвращением терминации («антитерминирование») на U-богатом участке (расположенного в 15-22 н.о. от 5'-конца гРНК) (A.J. Nay et al., 1977 (a); A.J. Nay et al., 1977(b); A.J. Nay et al., 1982). Для антитерминирования необходимо присутствие свободных NP белков, не связанных с нуклеокапсидом. Предположительно, связывание NP белка с синтезирующейся цепью РНК предотвращает повторяющееся копирование U-содержащего участка гРНК (A.R. Beaton, 1986).

Транскрипция гРНК, как и транскрипция кРНК, происходит без праймирования и в присутствии свободных NP белков, которые связываются с синтезирующейся цепью РНК (G.I. Shapiro et al., 1988). Таким образом, вновь синтезированные гРНК находятся в составе РНП, которые мигрируют из ядра в цитоплазму клетки для сборки новых вирионов.

Транспорт РНП из ядра осуществляется при участии белков М1 и NS2 в составе РНП-М1-NS2-комплекса (A.C. Ward et al., 1995; R.E. O'Neill et al., 1998).

В цикле репродукции вируса особая роль принадлежит NS1 белку. Этот белок препятствует экспорту клеточных мРНК из ядра в цитоплазму клетки (F.V. Alonso-Caplen et al., 1992; P. Fortes et al., 1994; X-Y. Qian et al., 1994).

Сборка и почкование вирионов вируса гриппа А происходит следующим образом. Синтезированные вирусные белки – НА, NA и М2 перемещаются

через мембрану эндоплазматического ретикулума и аппарат Гольджи к плазматической мембране клетки и экспонируются на ее поверхности (K.T. Elder et al., 1979; J.D. Hull et al., 1988; D.P. Nayak et al., 2004). РНП-М1-NS2-комплексы перемещаются к сайту сборки у плазматической мембраны. Взаимодействие белка М1 с цитоплазматическими частями вирусных белков НА, NA и М2 служит молекулярным сигналом для формирования вириона. Участок плазматической мембраны, содержащей вирусные белки, сгибается, окружая РНП-М1-NS2-комплексы, и выпячивается наружу. Слияние этого участка мембраны приводит к отпочкованию вирусной частицы (D.P. Nayak et al., 2004). Окончательное отделение вириона от поверхности клетки происходит после отщепления нейраминидазой сиаловых кислот от гликопротеинов клеточной и вирусной мембран. Отщепление сиаловых кислот предотвращает агрегацию вирионов с клеткой и между собой (P. Palese et al., 1974).

## **1.2 Антигенный дрейф и антигенный сдвиг**

Вирусы гриппа А имеют два основных механизма, обеспечивающих разнообразие в популяции вирусов, а именно: способность уклоняться от опосредованного антителами иммунитета, индуцированного во время ранее перенесенной инфекции или в результате вакцинации, путем постепенного накопления мутаций в НА и NA (антигенный дрейф), а также способность к реассортации сегментов генома (антигенный сдвиг) (S.C. Manrubia et al., 2005; P.E. Turner, 2003). Оба этих механизма дают возможность вирусу быстро изменяться и адаптироваться, что способствует развитию инфекции у новых видов хозяев. Способность быстро мутировать и адаптироваться не является уникальной среди РНК-вирусов, однако для некоторых вирусов характерны более высокие уровни изменений в последовательностях, по крайней мере, некоторых вирусных генов. Белки ВГА могут значительно различаться по аминокислотным последовательностям, особенно поверхностные гликопротеины – гемагглютинин и нейраминидаза (E. Nobusawa et al., 1991).

Эти различия в аминокислотных последовательностях приводят к антигенным различиям вирусов. Так, антитела к ВГА подтипа Н1 нейтрализуют только вирусы подтипа Н1, но не другие подтипы ВГА. Эти антигенные различия имеют важное значение, например, при вакцинации, поскольку защита вакцины обусловлена, прежде всего, специфическими антителами, продуцируемыми к гемагглютинину и, в меньшей степени, к нейраминидазе (C.W. Lee et al., 2004). Поэтому существующие в настоящее время вакцины ограничены обеспечением защиты только к определенному подтипу вируса. Для защиты от полного спектра ВГА в состав вакцины потребовалось бы добавить 16 различных антигенов, представляющих каждый подтип НА. Тем не менее, в настоящее время разрабатываются подходы для создания универсальных вакцин, основанные на других стратегиях.

Хотя нейтрализующие антитела к одному подтипу вируса гриппа НА должны нейтрализовать все вирусы этого же подтипа, различия в специфичности антител значительно влияют на степень защиты. Влияние антигенного дрейфа на вакцинацию против гриппа человека – хорошо описанная проблема, которая требует ежегодной оценки вакцинного штамма на соответствие циркулирующему (D.J. Smith, 2003). По всему миру в человеческой популяции эндемичными являются только два подтипа ВГА, а именно Н1N1 и Н3N2, и для обоих подтипов вируса существует одна родословная, которая восходит к тому времени, когда вирус был впервые занесен в организм человека (D.A. Buonagurio et al., 1986; R.M. Bush et al., 1999; O.T. Gorman et al., 1990). В отличие от вирусов гриппа животных, эти два подтипа вируса эволюционировали с небольшими изменениями в последовательностях, связанными с географическим происхождением вирусов. Глобальное распространение ВГА, вероятно, является результатом широкомасштабного и быстрого перемещения людей между регионами, что способствовало эффективной передаче вируса и позволило одновременно циркулировать лишь относительно небольшому количеству вариантов ВГА. Тем не менее, вирусы изменяются с быстрой, но предсказуемой скоростью,

которую иногда называют молекулярными часами (D.A. Buonagurio et al., 1986).

Наблюдаемые изменения в геноме появляются случайно и сконцентрированы в основном в поверхностных гликопротеинах (J. B. Plotkin, J. Dushoff, 2003). Вирусы гриппа, как и другие РНК-вирусы, не имеют механизма коррекции процесса репликации вирусной РНК, что приводит к ошибкам при транскрипции, приводящим к высокой частоте мутаций (P. Palese, M.L. Shaw, 2007). Высокая частота мутаций способствует появлению изменений, многие из которых губительны для вируса, ввиду того что в ходе подверженной ошибкам транскрипции создаются преждевременные стоп-кодоны, изменения в аминокислотах, которые приводят к появлению менее жизнеспособных вирусов. Также могут наблюдаться изменения в регуляторном сигнале, который влияет на репликацию вируса (O.G. Pybus et al., 2007). Большинство таких мутаций теряются в процессе селекции и в популяции остаются наиболее приспособленные вирусы. Частота мутаций для всех восьми сегментов генома, вероятно, одинакова, но вследствие селекционного процесса большее количество замен наблюдается в генах HA и NA (J. B. Plotkin, J. Dushoff, 2003).

Считается, что одним из первичных селективных факторов, влияющих на белок HA, является давление антител со стороны хозяина, появившихся как в результате предыдущего контакта с вирусом, так и в результате вакцинации (J. B. Plotkin, J. Dushoff, 2003). Для белка H3 вируса гриппа человека были охарактеризованы пять антигенных областей, где антитела к этим областям могут нейтрализовать вирус и, следовательно, защищать организм хозяина во время инфекции. Эти антигенные области находятся в районе головки белка HA, и многие из них располагаются рядом с рецептор-связывающим сайтом (R.G. Webster, W.G. Laver, 1980; D.C. Wiley et al., 1981; I. A. Wilson et al., 1981). Антитела к антигенным сайтам могут быть нейтрализующими, потому что они напрямую блокируют доступ к рецептор-связывающему сайту и предотвращают присоединение вируса к клетке и иницирование инфекции.

Эти антигенные области, однако, могут претерпевать значительные изменения, и когда происходят замены в ключевых аминокислотах, один из нейтрализующих эпитопов может быть изменен таким образом, что антитела больше не могут с ним связываться (R.G. Webster, W.G. Laver, 1980). Эти изменения в специфичности антител могут привести к появлению так называемых «ускользнувших» мутантов (от англ. «escape mutant»), когда на вирус не влияет способность антител хозяина контролировать инфекцию и это не препятствует активной репликации вируса. Накопление аминокислотных замен в этих антигенных участках является антигенным дрейфом, который приводит к тому, что вакцины против ВГА со временем становятся менее эффективными в плане защиты. Поэтому для вакцинных штаммов вирусов гриппа человека, как ВГА, так и ВГВ, необходимо ежегодно определять, эффективно ли нейтрализуются циркулирующие в настоящее время эпидемические штаммы антителами, продуцируемыми к вакцинному штамму. Также, важное значение имеет сравнительный анализ последовательностей вирусов, который позволяет оценить, когда и с какой частотой появляются новые варианты вирусов (D.J. Smith, 2003). Исходя из информации о последовательности, репрезентативные штаммы используются для производства антител с последующим проведением углубленных исследований в перекрестной реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Если в перекрестной РТГА дикие штаммы показывают четырехкратное или более различие в торможении, это свидетельствует о том, что имеющийся вакцинный штамм может быть неэффективным. По мере увеличения объема данных РТГА и развития технологий стало возможным использование компьютерных программ для составления наглядных карт антигенных различий. Этот метод исследования получил название антигенной картографии (M.A. Abbas et al., 2011; D.J. Smith et al., 2004). При производстве вакцин против сезонного гриппа человека необходимо точное соответствие вакцинного штамма эпидемическому, в противном случае это отрицательно сказывается на защитных свойствах вакцины (Y. Hirota, 1997). Чтобы

компенсировать антигенный дрейф, вакцинные штаммы обычно меняются каждые 3-4 года, (D.J. Smith, 2003).

Для вирусов гриппа домашних птиц также характерен антигенный дрейф, но интерпретация и важность антигенного дрейфа для ВГП намного сложнее. Принципы замен в антигенных сайтах, влияющих на специфичность нейтрализующих антител, одинаковы для иммунного ответа у домашней птицы, но момент, когда антигенные изменения требуют замены вакцинных штаммов, не определен. Частично это обусловлено различиями в патобиологии гриппа человека и НРАІ у птиц. При заболевании гриппом человека характерна вирусная инфекция слизистой оболочки дыхательных путей, тогда как при заражении НРАІ вирусом можно наблюдать системную инфекцию. Инактивированные вакцины, которые обычно используются при иммунизации людей и домашней птицы, обеспечивают высокий уровень сывороточных антител IgG (или IgY – птичий аналог IgG млекопитающих), при этом в значительно меньшей мере способствуют выработке секреторных IgA, которые являются наиболее эффективным классом антител, контролирующих гриппозную инфекцию, что было показано в экспериментах на мышах (K.V. Renegar et al., 2004). Транссудация IgG (IgY) на поверхность слизистой оболочки может обеспечить эффективный контроль клинического заболевания, но все же не обеспечивает идеальной защиты (S. Tamura, T. Kurata, 2004). У домашней птицы при инфекции LPAI и НРАІ на поверхности слизистой оболочки, вероятно, возникает аналогичный иммунный ответ. Однако тяжелое течение заболевания, наблюдаемое при инфекции НРАІ, происходит главным образом из-за системной инфекции, и, по-видимому, только подтип-специфические антитела способны эффективно блокировать вирусную репликацию и, следовательно, системную репликацию вируса (C.W. Lee, D. L. Suarez, 2005). На защитные свойства сывороточных антител и их способность блокировать вирусную репликацию и предотвращать тяжелое клиническое заболевание, по-видимому, меньше влияет антигенный дрейф, однако ранее было показано, что

степень инфицированности коррелирует со сходством вакцинного штамма с заражающим (C.W. Lee et al., 2004 (a); D.E. Swayne et al., 2000).

Одна из характерных особенностей ВГП – это большое разнообразие вариантов вируса, которые могут инфицировать домашнюю птицу. Поскольку большинство вспышек LPAI и HPAI являются результатом независимого проникновения вирусов из различных резервуаров диких птиц, в большинстве эпидемиологически не связанных вспышек вирусы антигенно отличаются друг от друга даже в пределах одного и того же подтипа (M. Garcia et al, 1997, C.W. Lee et al., 2004 (b)). Это антигенное разнообразие разделяется еще на североамериканскую и евразийскую линии, и чтобы обеспечить наилучшую защиту, выбор вакцинного штамма должен основываться как минимум на максимальной гомологии аминокислотной последовательности HA с циркулирующим штаммом (D.E. Swayne et al., 2000). Однако при выборе вакцинного штамма приходится учитывать много разных факторов.

Важная проблема, связанная с вирусами гриппа птиц и других животных, заключается в том, что, если вспышка становится широко распространенной, из-за определенных карантинных мер, ограничений на перемещение животных и продуктов животного происхождения может произойти географическое разделение вирусных популяций, что позволяет вирусу развиваться независимыми эволюционными путями. Такое географическое разделение наблюдалось во время нескольких вспышек, включая LPAI H5N2 в Мексике, LPAI H9N2 на Ближнем Востоке и в Азии, а также вспышки HPAI H5N1 в Азии, Европе и Африке (C.W. Lee et al., 2004 (a); WHO, 2005; K.M. Xu et al., 2007). Формирование множества различных линий HA дополнительно усложняет выбор вакцинного штамма, так как антигенный дрейф происходит независимо внутри каждой линии вирусов. Так, современная линия HPAI вирусов A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1) разделена на несколько сублиний, сформированных в систему клад, основанных, главным образом, на различиях в аминокислотных последовательностях гена HA. Антигенный дрейф привел к тому, что в

настоящее время уже определены клады пятого порядка. Например, циркулирующие вирусы клады 2.3.2.1 сейчас дополнительно разделены на основании различий в аминокислотных последовательностях на 2.3.2.1a, 2.3.2.1b и 2.3.2.1c (WHO, 2014). Поэтому, например, из-за антигенных различий между отдельными линиями вирусов, оптимальным является использование вакцин на основе штаммов, полученных при помощи обратной генетики (С. Li et al., 2014). Это позволяет использовать для производства вакцин штаммы с требуемой антигенной специфичностью, сохраняя возможность быстро модифицировать применяемые вакцины, следуя изменениям в антигенных свойствах циркулирующих штаммов.

Для человека и животных, продолжительность жизни которых дольше, чем у птиц, существует дополнительная проблема, связанная с вирусом гриппа – антигенный сдвиг. Антигенный сдвиг, как правило, характерен для ВГА человека, однако он также был показан для ВГА животных. Антигенный сдвиг происходит, когда большая часть популяции-хозяина ранее подвергалась воздействию инфекции или вакцинации определенным подтипом НА, а затем она подверглась воздействию другого подтипа НА (W.R. Dowdle, G.C. Schild, 1976). Поскольку популяция хозяина практически не имеет защитного иммунитета против нового варианта вируса, он может быстро распространиться среди этой популяции и вызывать вспышку заболевания, которая может развиться в пандемию. В прошлом веке было зарегистрировано три основных пандемии. Наиболее тяжелым было появление вируса H1N1, который, вероятно, заменил вирус гриппа человека подтипа H2 в 1918 году, что привело к серьезной пандемии, в результате которой погибло более 40 миллионов человек (J.K. Taubenberger, D.M. Morens, 2006). Вторая пандемия 20 века произошла в 1957 году, когда вирус H1N1 был вытеснен вирусом H2N2. Третья пандемия началась в 1968 году, когда вирус H3N2 вытеснил вирус H2N2 (P.F. Wright et al., 2007). Последняя пандемия, уже в 21 веке, была вызвана вирусом гриппа H1N1 и случилась в 2009 году. Этот вирус, хотя и имел тот же подтип, что и у циркулировавшего сезонного вируса гриппа,

значительно отличался от него антигенно, что позволило ему быстро распространиться среди людей, и в конечном итоге, вытеснить циркулировавший вариант H1N1 из популяции. (G.J. Smith et al., 2009). Причины возникновения новых пандемических вирусов до сих пор окончательно не ясны. По-видимому, их появление может быть вызвано проникновением в человеческую популяцию совершенно нового варианта ВГА или реассортацией циркулирующего варианта ВГА человека с ВГА животных (P.F. Wright et al., 2007). Вирус H1N1 1918 года, по-видимому, был совершенно новым вирусом для человека, но вирусы H2N2 и H3N2 были реассортантами, у которых произошла замена нескольких генов, включая, что особенно важно, ген НА (P.F. Wright et al., 2007). Вирус H1N1 2009 года был тесно связан с вирусом гриппа свиней, циркулирующим в Северной Америке, но его реассортация с неизвестным вирусом привела к появлению у него двух новых генов, которые позволили вирусу активно реплицироваться и хорошо передаваться от человека к человеку (G.J. Smith et al., 2009).

Яркий пример антигенного сдвига среди вирусов гриппа животных — это вирусы гриппа лошадей. Исторически от лошадей выделялись вирусы гриппа подтипа H7N7, которые, по-видимому, циркулировали в популяциях лошадей в течение длительного периода времени. В 1963 году появился новый подтип — H3N8. Случаи инфицирования лошадей этим вирусом регистрировались во всем мире, и в конечном итоге он полностью заменил циркулировавший до этого вариант H7N7, причем последний изолят этого подтипа был выделен в 1979 году (P.J. Collins et al., 2014; R.D. Paillot et al., 2006).

По данным исследований, проводимых в США, среди свиней единственным подтипом вируса гриппа, который циркулировал с 1918 до конца 1990-х годов, был H1N1. Однако, начиная с 1998 года, от свиней начали выделяться вирусы подтипа H3N2. Эти вирусы были необычными реассортантами, которые имели гены вируса гриппа свиней H1N1, гены вируса гриппа человека и гены ВГП. В настоящее время в США среди свиней

циркулируют вирусы гриппа H1N1, H3N2, и другие реассортанты (например, H1N2 и H3N1) (A.I. Karasin et al., 2000; A.I. Karasin et al., 2004). Учитывая результаты антигенного сдвига, становится понятной необходимость регулярного обновления гриппозных вакцин для лошадей и свиней, которые будут включать новые вирусы и обеспечивать адекватную защиту. Тем не менее, компании, производящие вакцины, не проявляют особой активности в производстве новых вакцин. Многие вакцины для лошадей включают вирус гриппа H7N7 в качестве антигена, хотя он не регистрировался более 35 лет.

Для домашней птицы антигенный сдвиг не является главной проблемой из-за короткого срока жизни на большинстве производств. Поскольку заражение ВГП было редким явлением, коммерческая домашняя птица не подвергалась естественному воздействию вируса, а вакцинация до сих пор широко не практикуется, за исключением вакцинации от H5N1 в Китае, Египте, Индонезии, Вьетнаме и Бангладеш, поэтому большинство домашней птицы полностью подвержено заражению любым подтипом гриппа.

### **1.3 Молекулярные маркеры, влияющие на биологические свойства вирусов гриппа птиц.**

Генетическая изменчивость, которая способствует изменениям свойств вирусов, таких как эффективность связывания с рецепторами клеток, репликативная способность и трансмиссивность, является важным компонентом оценки риска возникновения пандемических штаммов. Исторически оценка этих факторов происходит *in vivo*, однако возможность оценивать эти свойства *in silico* на основе данных о последовательностях генома вирусов позволяет более быстро и эффективно оценивать вновь выявляемые штаммы. В настоящее время описан ряд экспериментально подтвержденных молекулярных маркеров, влияющих на биологические характеристики вирусов гриппа птиц (Suttie A. et al., 2019).

Мутации в HA, которые влияют на изменение связывания с рецепторами  $\alpha 2,3$  на рецепторы  $\alpha 2,6$ , считаются ключевыми факторами пандемического

потенциала ВГП. Так, две мутации – E190D и G225D усиливают связывание с рецепторами «человеческого типа», также как это описано для «испанского» пандемического вируса 1918 года H1N1 и пандемического вируса H1N1pdm09 (M. Lazniewski et al. 2018). Однако влияние этих мутаций на другие варианты вируса, по-видимому, зависит от подтипа. Было описано, что единичная мутация G225D изменяет рецепторное предпочтение вируса H6N1, выделенного от человека на Тайване, на связывание с рецепторами  $\alpha 2,6$ , в то же время аналогичная замена в вирусах подтипа H5 не увеличивает сродство к рецепторам  $\alpha 2,6$  (S. Chutinimitkul et al., 2010). Также, для подтипа H5 вирусов гриппа описаны подтвержденные экспериментально мутации H103Y, которая увеличивает трансмиссивность, а также K387I, способствующая увеличению эффективности репликации вируса и повышению вирулентности для мышей, одновременно снижая вирулентность для уток (M. Linster et al., 2014).

Изменения в NA, втором по значимости трансмембранном белке, присутствующем на поверхности вируса гриппа, также могут отвечать за инфекционность, вирулентность и репликативную эффективность вирусов гриппа. Важной характеристикой является длина стебля NA, которая значительно варьирует между различными вариантами ВГП, и укорочение этого домена может свидетельствовать об адаптации вирусов диких птиц к домашней птице (S. Munier et al., 2010). Делеция стебля NA из девятнадцати аминокислот обычно наблюдается у высокопатогенных вирусов H5N1, и эта делеция ассоциируется с повышенной репликативной способностью в организме мышей (Y. Matsuoka et al. 2009). Также было показано, что экспериментально введенные делеции стебля NA в подтипах H1N1, H7N1, H9N2 и H7N9 увеличивают патогенность вируса для мышей и кур (T.W. Hoffmann et al., 2012; Y. Bi et al., 2016).

Функция NA имеет очень важное значение при инфекции различными вариантами ВГП. Ингибиторы нейраминидазы, разработанные в качестве противовирусных средств в 1990-х годах, связываются с активным сайтом NA и предотвращают высвобождение вирионов с поверхности инфицированной

клетки. Большинство мутаций в NA – это маркеры, связанные с устойчивостью к основным ингибиторам нейраминидазы, используемым в настоящее время во всем мире: осельтамивиру, занамивиру и др. Несмотря на то, что противовирусные соединения успешно используются в течение нескольких десятилетий, распространенность устойчивых к ингибиторам нейраминидазы штаммов растет, так же как список выявленных а.к. замен, отвечающих за их устойчивость (Suttie A. et al., 2019).

Мутации в белках полимеразного комплекса, PB1 и PA, влияют на репликативную способность вируса и активность полимеразы. Описан целый ряд аминокислотных замен, которые увеличивают вирулентность ВГП для мышей: в PB1 – это K577E, D622G; в PA – V63I, T97I, K142N/E, K356R, S421I, R443K и K615N (A.S. Taft et al., 2015). Комбинация двух мутаций в PA, S224P и N383D, увеличивает полимеразную активность вируса подтипа H5N1 и усиливает репликацию вируса в клетках млекопитающих и птиц. Эта комбинация замен также увеличивает вирулентность H5N1 как у мышей, так и у уток (J. Song et al., 2015).

Восьмой сегмент генома вируса (NS) кодирует три вирусных белка: NS1, NS2 и NS3. Функция белка NS3 до сих пор остается в значительной степени неизвестной, однако установлено, что единичные аминокислотные замены и делеции в NS1 и NS2 могут влиять на репликацию и патогенность ВГП. Экспериментально показано, что замены P42S, F89Y, V149A, N200S и G205R в NS1 снижают противовирусный ответ у кур, хорьков и мышей (M. Selman et al., 2012). Делеция в 5 аминокислот у вирусов подтипа H5N1 в позиции с 80 по 84 связана с увеличением вирулентности для мышей и кур (J.X. Long et al., 2008). Адаптивные мутации в NS2, описанные для вируса гриппа H5N1, выделенного от человека, включают M16I, которая, индивидуально или в комбинации с Y41C и E75G, увеличивает активность вирусной полимеразы при инфицировании клеток млекопитающих (B. Manz et al., 2013). Кроме того, две комбинации мутаций в NS1 и NS2: T47A и N200S и M51I и G205R

соответственно, снижают противовирусный ответ у хорьков (H. Imai et al., 2010).

Для седьмого сегмента генома (MP), который кодирует белки M1 и M2, описано небольшое количество мутаций, которые в основном связаны с адаптацией вируса к различным хозяевам. Все они происходят в области, кодирующей белок M1. Аминокислотные замены N30D, I43M, T139A и T215A увеличивают вирулентность ВГП для мышей (C.A. Smeenk et al., 1996). При этом, I43M также увеличивает вирулентность ВГП для кур и уток (N. Nao et al., 2015). Белок M2 является важной мишенью для противовирусных препаратов, и мутации в этой области отвечают за устойчивость вируса к адамантанам (амантадин и римантадин), которые блокируют ионный канал M2 и подавляют ранние стадии репликации вируса. Этот класс препаратов в настоящее время не рекомендуется к применению, поскольку большинство вирусов, в том числе подтипов H5 и H7, обладают высокой степенью устойчивости (G. Dong et al., 2015). Хорошо известные мутации, связанные с устойчивостью к адамантану в M2, включают: L26F, V27A, A30V/T/S, S31N/G и G34E (Y. Lan et al., 2010).

#### **1.4 История изучения вируса гриппа птиц**

Первое описание гриппа птиц датируется 1878 годом, когда в северной части Италии Perroncito описал высококонтагиозное заболевание птицы, характеризующееся высокой смертностью. Заболевание, названное "чумой домашней птицы", первоначально путали с острой септицемической формой холеры птиц. Однако в 1880 году, вскоре после первого описания, Rivolta и Delprato, основываясь на клинических и патологических свойствах, показали, что она отличается от холеры птиц, и назвали ее *Typhus exudatious gallinarum*. В 1901 г. Centanni и Savunzzi установили, что чума птиц была вызвана фильтрующимся агентом – вирусом; однако только в 1955 г. классический вирус чумы птиц был признан вирусом гриппа типа А на основании наличия специфичного рибонуклеопротеина. Термин "чума домашней птицы" был

заменен более подходящим термином "высокопатогенный вирус гриппа птиц" (HPAI – highly pathogenic avian influenza) на Первом международном симпозиуме по птичьему гриппу (B. Lupiani, S.M. Reddy, 2009).

Вероятно, вспышки высокопатогенного вируса гриппа птиц (HPAI) случались в Италии и других европейских странах до первого описания E. Perroncito и дифференциации от холеры птиц Rivolta и Delprato в 1880 году. Сообщалось также о следующих вспышках HPAI в Италии в 1894 и 1901 годах, которые впоследствии распространились в восточную Австрию и Германию, а затем в Бельгию и Францию благодаря торговле домашней птицей (L. Wilkinson, A.P. Waterson, 1975). Распространению HPAI в Германию способствовала птицеводческая ярмарка в Брауншвейге в 1901 году, где после обнаружения больных птиц власти закрыли эту ярмарку и отправили зараженное поголовье в места его происхождения, что еще больше усугубило ситуацию. HPAI стал эндемичным во всей Италии и Центральной Европе, пока не исчез примерно в середине 1930 года (M. Petek, 1982). Тем не менее, важно отметить, что отсутствие в то время соответствующих диагностических тест-систем и одновременная циркуляция вируса болезни Ньюкасла (B. Lupiani, S.M. Reddy, 2009) среди домашней птицы в начале 1900-х годов не позволяет определить, какой из двух вирусов был ответственен за вспышки, о которых сообщалось.

К середине 1900-х годов HPAI был зарегистрирован в большинстве стран Европы, Северной и Южной Америки, Ближнего Востока, Африки и Азии, в том числе и в России (E.L. Stubbs, 1952; C. Todd, J.P. Rice, 1930).

В ранние годы развития вирусологии HPAI использовался в качестве модельного агента, особенно из-за простоты работы с курами в качестве экспериментальных животных (L. Wilkinson, A.P. Waterson, 1975). В то время HPAI сравнивали с бешенством, благодаря неврологическим симптомам, которые возникали после заражения. Также, высокая смертность и тяжесть симптомов, связанных с HPAI, не позволяли определить связь с вирусами гриппа человека.

В 1934 г. F.M. Burnet и J.D. Ferry (F.M. Burnet, J.D. Ferry, 1934) показали, что вирусы как НРАІ, так и болезни Ньюкасла можно титровать на РКЭ, исходя из их способности приводить к гибели эмбриона. Интересно, что только в 1936 г. F.M. Burnet показал, что эмбриональные куриные яйца могут быть использованы для культивирования вирусов гриппа (F.M. Burnet, 1936). После открытия гемагглютинирующей активности вирусов гриппа (G.K. Hirst, 1941), D. Lush (D. Lush, 1942) показал, что вирусы НРАІ и болезни Ньюкасла способны агглютинировать эритроциты и, что более важно, между этими двумя вирусами птиц не существует серологической связи (W. Schafer, 1955).

Новая эра в истории ВГП началась в середине 1900-х годов, когда впервые были выделены менее вирулентные формы ВГП. Так называемый вирус "N" был выделен от погибшей взрослой курицы в Германии (A/chicken/Germany/49 (H10N7)) (Z. Dinter, 1949; Z. Dinter, 1964), но не признавался вирусом гриппа птиц до 1960 г. (R. Rott, W. Schafer, 1960). Также, несколько вирусов были выделены от домашних уток в Канаде (A/Duck/Canada/52 (H10N7)) (R.V.L. Walker, G.L. Bannister, 1953), Чехословакии (A/duck/Czechoslovakia/56 (H4N6)) (Z. Koppel et al., 1956), Англии (A/duck/England/56 (H11N6)) (D.H. Roberts, 1964) и Украине (A/duck/Ukraine/60 (H11N8)) (P.F. Tsimokh, 1961).

До середины 1950-х годов все выделенные вирусы НРАІ (чума домашней птицы) относились к подтипу Н7. Однако в 1959 и 1961 годах в Шотландии были выделены два вируса НРАІ подтипа Н5, вызывающие клиническое заболевание, схожее с классической чумой птиц, (A/chicken/Scotland/59 (H5N1)) (H.G. Pereira et al., 1965) и в Южной Африке (A/tern/South Africa/61 (H5N3)) (M.K. Rowan, 1961). Это привело к ошибочному мнению, что все вирусы Н5 и Н7 являются высокопатогенными. Позже это утверждение было опровергнуто, когда низкопатогенные вирусы Н5 и Н7 были выделены от индейки в Канаде (A/turkey/Ontario/66 (H5N9)) (B.C. Easterday, V. Tumova, 1972), Висконсине (A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9))

(L.K. Smithies et al., 1969) и Орегоне (A/turkey/Oregon/71 (H7N3)) (C.W. Beard, D.H. Helder, 1972). Кроме того, в 1960-х годах несколько низкопатогенных ВГП различных подтипов были выделены от индюков, цыплят, уток, перепелов, фазанов и куропаток (B.C. Easterday, В. Tumova, 1972) с респираторными и репродуктивными признаками заболевания, что позволило пролить новый свет на большое разнообразие, существующее среди вирусов гриппа птиц.

Свидетельства потенциальной роли гриппа животных в возникновении пандемий среди людей побудили Всемирную Организацию Здравоохранения еще в 1958 году инициировать проведение исследований по экологии этих вирусов среди диких животных (D.J. Alexander, 1986). Однако только через 10 лет серологические исследования диких птиц продемонстрировали наличие инфекции ВГП у диких птиц в США, Австралии и России (C.A. Dasen, W.G. Laver, 1970; B.C. Easterday et al., 1968; A.N. Slepuskin et al., 1972; W.G. Winkler et al., 1972; L.J. Zakstelskaya et al., 1972). До 1973 года от диких птиц ВГА выделялись только дважды: от речной крачки (*Sterna hirundo*) – штамм A/tern/South Africa/61 (H5N9) (M.K. Rowan, 1961; W.B. Becker, 1966) и от клинохвостого буревестника (*Puffinus pacificus*) – штамм A/shearwater/East Australia/72 (H6N5) (J.C. Downie, W.G. Laver, 1973). С тех пор вирусы гриппа А были выделены по меньшей мере от 105 видов диких птиц, принадлежащих 26 различным семействам (B. Olsen et al., 2006).

Выделение большого количества штаммов ВГП и признание диких водоплавающих и береговых птиц в качестве резервуаров вируса гриппа А привело к изменению их классификации. Первоначально вирусы гриппа классифицировались на основе вида хозяина и серологической активности нуклеопротеина (NP), по которому определяли тип, а также гемагглютинина (HA) с нейраминидазой (NA), по которым определяли подтип с помощью реакции двойной иммунодиффузии (WHO, 1971). Так, например, до 1980 года номенклатура вирусов гриппа А была представлена следующим образом: Nav5 Nav1 или Neq1 Neq1, где «av» обозначает грипп птиц (от avian), а «eq» – грипп

лошадей (от equine). Однако признание того факта, что вирусы, серологически связанные с вирусами человека, свиней и лошадей, также присутствовали в популяции диких птиц, привело к единой системе классификации, которая используется в настоящее время (WHO, 1980).

### **1.5 Экология вируса гриппа птиц**

Естественным хозяином и природным резервуаром всех подтипов вируса гриппа А являются дикие птицы, преимущественно водоплавающие или околоводные (R.G. Webster et al., 1992; B. Olsen et al., 2006). В дикой природе эволюция вируса протекает медленно, сохраняя при этом высокую консервативность большинства генов внутренних белков (D.L. Suarez, 2000). Поверхностные гликопротеины, HA и NA, гораздо более изменчивы, и гены этих белков демонстрируют большее разнообразие. Для обоих белков были охарактеризованы множественные антигенные подтипы, для которых характерно то, что антитела к одному подтипу нейтрализуют, с высокой специфичностью, только вирусы этого подтипа. Для белка NA вирусов гриппа птиц были охарактеризованы 16 подтипов ВГА и 9 подтипов были охарактеризованы для белка NA (рис. 5). На уровне аминокислот разница между подтипами составляет всего 20%, но между некоторыми подтипами различия достигают 63%. При этом, около 25% аминокислот являются консервативными у всех 16 подтипов HA (E. Nobusawa, 1991). Подобная картина наблюдается среди различных подтипов NA, у которых процент различий между аминокислотными последовательностями находится между 31% и 61%.

При сравнении нуклеотидных последовательностей большинства сегментов генома ВГА, выделенных от диких птиц, в том числе в генах HA и NA, обнаружено четкое разделение между вирусами, выделенными в Европе, Азии, Африке и Австралии (Евразийская линия), и вирусами, выделенными в Америке (Американская линия) (D.L. Suarez, 2000).

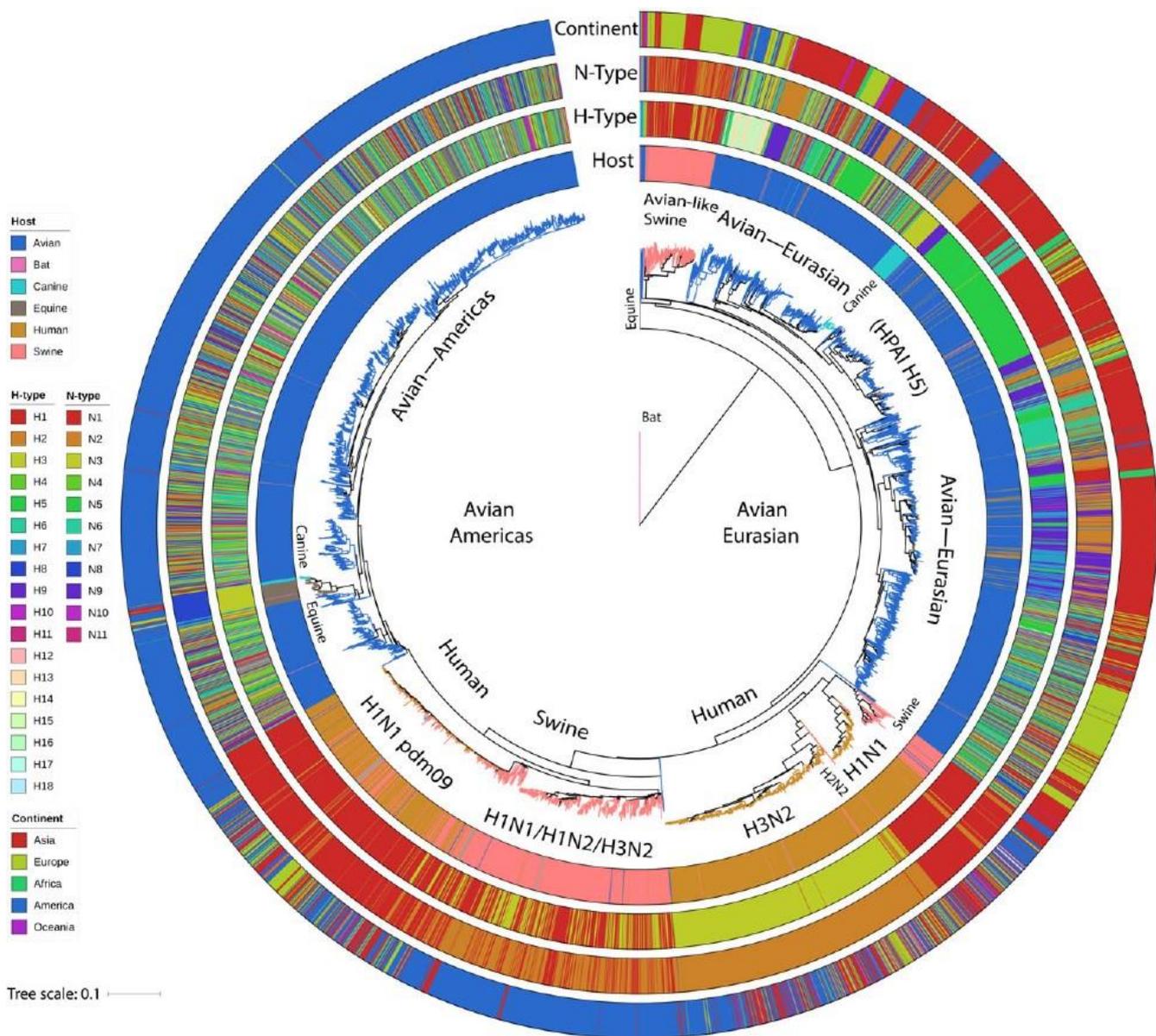


Рисунок 5. Филогенетическое дерево всех известных подтипов вируса гриппа А (S. J. Lycett et al., 2019)

При этом, различия между аминокислотными последовательностями более консервативных внутренних белков американской и евразийской линий ВГА отсутствуют, тогда как гены HA и NA, имеющие наибольшее разнообразие нуклеотидных последовательностей, четко разделяются на евразийские и американские линии среди большинства подтипов гемагглютинина.

Для подтипа H7, например, может наблюдаться дополнительное разделение линии вирусов Северной Америки и Южной Америки, а также вирусов Австралии, Европы и Азии (D.L. Suarez et al., 2004). Данное различие

между вирусами гриппа подтипа H7, возможно, связано с отсутствием достаточного количества последовательностей геномов вирусов. Так, например, доступно относительно небольшое количество нуклеотидных последовательностей вирусов гриппа из Южной Америки. Дифференциация изолятов вируса гриппа, выделенных от диких птиц, на отдельные линии Старого и Нового Света, вероятно, связана с тем, что между вирусами этих двух географических регионов редко происходит обмен генами ВГА. Однако недавняя вспышка 2014 года в Северной Америке, вызванная высокопатогенным вирусом гриппа H5N8 Евразийской линии показывает, что иногда вирусы могут распространяться на большие расстояния (M.A. Jhung, D.I. Nelson, 2015).

Тем не менее, из общего правила разделения вирусов гриппа птиц на американскую и евразийскую линии появляется все больше исключений, по мере того как появляется больше информации о вирусах гриппа птиц и становятся доступными все больше геномных последовательностей ВГА. Например, вирусы гриппа подтипа H2, выделенные от домашних кур и уток, следуют правилу разделения вирусов гриппа птиц на американскую и евразийскую линии, тогда как североамериканские вирусы гриппа, выделенные от водоплавающих птиц и чаек, более тесно связаны с изолятами евразийского происхождения, чем с другими изолятами подтипа H2, выделенными в Северной Америке (N.V. Makarova et al., 1999; J.R. Schafer et al., 1993). Тем не менее, хотя вирусы подтипа H2, выделенные от водоплавающих птиц и чаек, имеют высокую степень идентичности с вирусами евразийской линии, они формируют отдельную сублинию. Схожая картина была показана и для вирусов гриппа подтипа H6, выделенных от водоплавающих птиц Северной Америки. Эти вирусы были также тесно связаны с вирусами евразийской линии, хотя для внутренних белков этих вирусов, включая матричные и неструктурные, было показано американское происхождение (E. Spackman et al., 2005). Эти данные, вероятно, показывают существование уникальной субпопуляции гена гемагглютинаина,

циркулирующего в Северной Америке, и свидетельствуют о том, что за последнее время не происходило перемещения вирусных генов евразийского происхождения в Америку.

Полный спектр хозяев ВГА среди диких птиц неизвестен, но на основании ряда исследований наиболее подвержены инфицированию два отряда диких птиц – гусеобразные (*Anseriformes*) и ржанкообразные (*Charadriiformes*). Отряд гусеобразные включает в себя уток, гусей и лебедей, но наибольший процент инфицирования наблюдается среди представителей рода речные утки (*Anas*), таких, например, как кряква (*Anas platyrhynchos*), шилохвость (*Anas acuta*) и чирок-свистун (*Anas crecca*). При этом инфицированность вирусом гриппа носит сезонный характер. Было показано, что наибольший процент выделения ВГА от птиц наблюдался в осенний период, причем больше у молодых особей (D.E. Stallknecht, 1998). У представителей отряда ржанкообразные, таких как чайки и кулики, наблюдается более низкий процент инфицирования.

Вирусы гриппа птиц легко распространяются среди различных видов диких птиц, и в настоящее время невозможно на основе нуклеотидной последовательности генома вируса определить вид птицы, от которой был выделен вирус. Единственное возможное исключение из этого правила состоит в том, что большинство ВГА подтипов H13 и H16 были выделены от чаек. В связи с этим, по крайней мере, для некоторых генов внутренних белков ВГА, можно выделить отдельную линию вируса гриппа чаек (рис. 5) (D.L. Suarez, M.L. Perdue, 1998; O.T. Gorman et al., 1990).

## **1.6 Основной хозяин вируса гриппа**

Прошло более 50 лет с тех пор, как вирус гриппа птиц был впервые выделен от крачки (*Sterna hirundo*) в Южной Африке (W.V. Becker, 1966). Несмотря на ограниченные данные более ранних исследований ВГП, полевые исследования, проводившиеся с 1970-х по 1990-е годы, значительно расширили понимание экологии ВГП среди диких птиц. Интерес к этой теме

возрос в 2002 году в связи с обнаружением высокопатогенного ВГП подтипа H5N1 у диких птиц в Гонконге и его последующим распространением среди популяций птиц в Евразии и Африке. При этом, резко возросло количество публикаций, касающихся мониторинга вируса гриппа птиц и его экологии (В.Н. Ноуе et al., 2010). Усиление эпиднадзора и исследовательской деятельности в отношении ВГП привело к гораздо более детальному пониманию спектра хозяев, ареала распространения, генетического разнообразия ВГП в популяциях восприимчивых животных, механизмов передачи и сохранения в природе, а также рисков, связанных с высокопатогенными вирусами, такими как H5N1, которые распространены в популяциях домашних и диких птиц.

К настоящему времени опубликован ряд обзорных статей, в которых представлена подробная информация о спектре хозяев ВГП среди диких птиц (В. Olsen et al., 2006; D.E. Stallknecht, S.M. Shane, 1988; D.E. Stallknecht, J.D. Brown, 2008). Этот список регулярно пополняется новыми видами благодаря последним наблюдениям и исследованиям. Однако, сложно оценить реальный спектр хозяев ВГП, поскольку эти исследования основаны на зарегистрированных случаях выделения ВГП от птиц. Существует множество дополнительных данных, основанных на результатах полимеразной цепной реакции (ПЦР), среди видов, от которых вирус не выделен, а также есть много видов птиц, которые никогда не тестировались на наличие ВГА. Соответственно, спектр хозяев лишь частично определяется восприимчивостью видов. Причина этого кроется в генетических и эколого-географических различиях у более чем 9000 видов диких птиц, существующих во всем мире (L.Z. Garamszegi, A.P. Moller, 2007).

Хотя количество и разнообразие птиц, от которых были выделены ВГП, обширны, существуют некоторые таксономические и экологические характеристики, определяющие основные виды-носители ВГП. Большинство из них связаны с водной средой обитания, однако, даже в пределах одного отряда наблюдаются различия в плане носительства ВГП. Например, в отряде

Гусеобразные большинство случаев инфекции ВГП было зарегистрировано среди представителей подсемейства Настоящие утки (*Anatinae*) (речные и нырковые утки). Различия также наблюдаются и среди представителей *Anatinae*, с различными показателями по выделению ВГП от видов в этом подсемействе. Было показано, что наибольший процент вирусывыделения наблюдается у речных уток, затем у нырковых уток и гусей (M.T. Harris et al., 2010; V.J. Munster et al., 2007; D.E. Stallknecht, S.M. Shane, 1988; B.R. Wilcox et al., 2011), а среди речных уток наибольший процент вирусывыделения был отмечен среди крякв (*Anas platyrhynchos*) (H. Nishiura et al., 2009).

Восприимчивость отдельных видов к вирусу гриппа по большей части связана с образом жизни диких птиц. Так, некоторыми факторами, которые влияют на передачу инфекции, являются среда обитания, тип кормления и особенности миграции птиц. С другой стороны, надо учитывать тот факт, что информация о распространении ВГП, зачастую, получается от исследования видов птиц, которые наиболее широко распространены, легко добываемы и традиционно характеризуются высоким процентом выделения ВГП.

Вирусы гриппа птиц были изолированы от видов, принадлежащих, по крайней мере, к четырем семействам отряда ржанкообразные (бекасовые (*Scolopacidae*), ржанковые (*Charadriidae*), чайковые (*Laridae*) и чистиковые (*Alcidae*)), но наиболее стабильным источником положительных результатов являются чайки (*Laridae*). При этом, сообщения о выделении ВГП от других птиц этого семейства, таких как крачки, относительно немногочисленны (V.J. Munster et al., 2007).

В литературе также имеются сообщения о выделении ВГП от других видов, связанных с водной средой обитания, включая птиц отрядов Аистообразные (*Ciconiiformes*), Гагарообразные (*Gaviiformes*), Журавлеобразные (*Gruiformes*), Пеликанообразные (*Pelecaniformes*), Поганкообразные (*Podicipediformes*) и Буревестникообразные (*Procellariiformes*) (R. Iftimovici et al., 1980; C. Lebarbenchon et al., 2010; J.Y. Takekawa et al., 2013; A. Boudreault et al., 1980; C. Lebarbenchon et al., 2015; J.C.

Downie, W.G. Laver, 1973; J.C. Downie et al., 1977; J.S. Mackenzie et al., 1984; L.Y. Zakstelskaya et al., 1974; N.S. Lewis et al., 2013; M. Lipkind et al., 1981; K. Ottis, P.A. Bachmann, 1983; J. Romvary et al., 1976; E. Perez-Ramirez et al., 2010; S. Pfitzer et al., 2000; I.G. Roslaya et al., 1974; I.G. Roslaya et al., 1975). Однако в совокупности на виды птиц, принадлежащих к этим отрядам, приходится небольшое количество случаев выделения ВГП. Вероятно, большинство из этих случаев связаны с распространением вирусов от уток и чаек через общую водную среду обитания. Такой путь распространения ВГП был недавно показан при исследовании изолятов, выделенных от американских бурых пеликанов (*Pelicanus Occidentalis*) (С. Lebarbenchon et al., 2010) и серощеких поганок (*Podiceps grisegena*) (С. Lebarbenchon et al., 2015), обитающих в штате Миннесота, США. В обоих случаях исследование вирусов, выделенных от этих видов птиц, достоверно показало их происхождение от вирусов уток и чаек.

Имеются также сообщения о выделении ВГП от видов птиц, принадлежащих к отрядам голубеобразные (*Columbiformes*), дятлообразные (*Piciformes*) и воробьинообразные (*Passeriformes*), которые обычно не связаны с околотовными местообитаниями, но случаев выделения ВГП от этих птиц описано немного. В относительно недавнем обзоре (M.J. Slusher et al., 2014), в котором описывалось выделение ВГП от птиц отряда воробьинообразные, результаты ПЦР и серологического тестирования, был сделан вывод, что птицы данного отряда, скорее всего, не участвуют в циркуляции и распространении ВГП в природе. Однако в условиях, когда эти птицы контактируют с домашними птицами, инфицированными ВГП, они могут быть инфицированы и играть определенную роль в дальнейшей передаче инфекции (M.J. Slusher et al., 2014).

Подобное взаимоотношение вирус-хозяин было подтверждено широкомасштабными серологическими исследованиями (J.D. Brown et al., 2009). Так, например, результаты серологических исследований выявили первые свидетельства того, что утки вовлечены в эпидемиологию ВГП (F.D.

Asplin, 1970). Более поздние исследования показали, что антитела к ВГП также могут быть выявлены у некоторых видов птиц, от которых редко выделяют ВГП или у которых наблюдается стабильно низкий уровень инфицированности. Это было отмечено среди таких видов как исландский песочник (*Calidris canutus*) (А.М. Maxted et al., 2012), канадская казарка (*Branta canadensis*) (М.Т. Harris et al., 2010; W.М. Kistler et al., 2012) и короткоклювый гуменник (*Anser brachyrhynchus*) (В.Д. Нойе et al., 2011). Эти результаты свидетельствуют о том, что многие из этих видов могут быть инфицированы в течение жизни, при этом, не показывая высокий уровень носительства ВГП, как это ежегодно наблюдается у уток в конце лета и осенью. Поскольку многие из этих видов являются долгоживущими, низкий уровень носительства ВГП может быть связан с возрастной структурой популяции и, как следствие, с формированием популяционного иммунитета.

### **1.7 Резервуар вируса гриппа птиц**

Хорошо известно, что все ВГП, которые способны инфицировать птиц и млекопитающих, исторически имеют происхождение из природного резервуара диких птиц (рис. 6).

Единственным исключением из этого могут быть вирусы гриппа летучих мышей (H17N10 и H18N11), которые до настоящего времени не были выделены от птиц или циркулировали среди других видов хозяев (S.X. Tong et al., 2012; S.X. Tong et al., 2013).

В соответствии с (S.X. Tong et al., 2012) резервуар инфекции представляет собой «любой живой или неживой объект, или их комбинации, которые служат средой обитания патогена, способствует его размножению и передаче восприимчивому хозяину». При определении резервуара ВГП важно понимать, что он представляет собой мультивидовую систему, которая обеспечивает сохранение этих вирусов в природе. Также надо отметить, что резервуары могут изменяться по мере того, как эти вирусы распространяются и эволюционируют в популяциях новых видов хозяев.

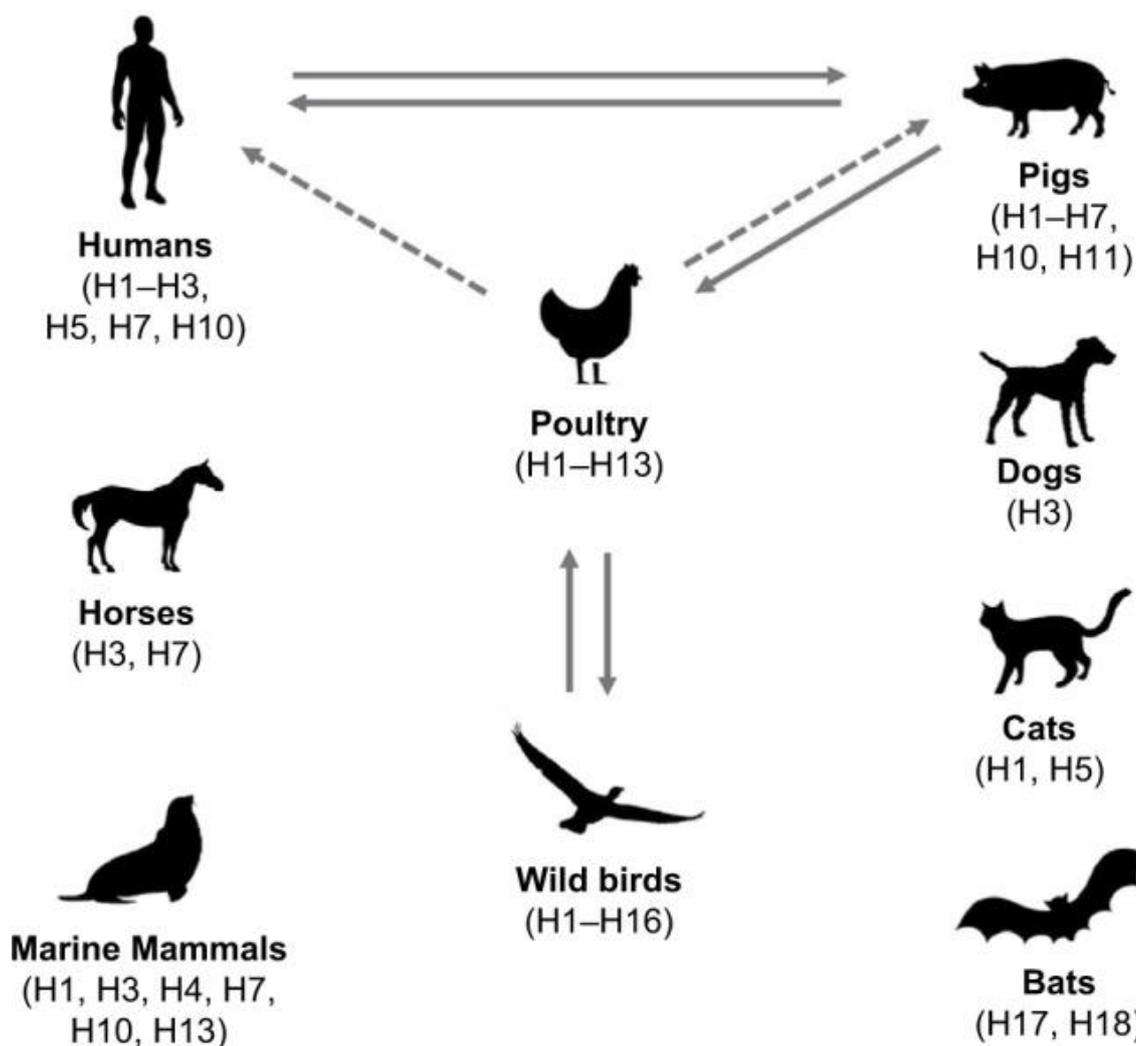


Рисунок 6. Основные хозяева различных подтипов вируса гриппа А (M. Hussain et al., 2017).

Как было показано ранее, на основании информации о циркуляции ВГП среди диких птиц, выделены две основные таксономические группы, которые представляют собой перекрывающиеся, а в некоторых случаях уникальные резервуары ВГП. Однако это не означает, что все виды в этих группах в равной степени способствуют сохранению ВГП в природе. В некоторых случаях роль отдельных видов в поддержании вируса может быть неоднозначна. Например, кряквы являются важной частью резервуара ВГП и часто отмечаются как наиболее важный вид, связанный с распространением ВГП. Однако этот вид часто сосуществует со многими другими видами из семейства речные утки. Кроме того, во многих районах зимовок в Северной Америке, таких как прибрежные болота, окружающие Мексиканский залив, кряква не является преобладающим видом уток, тогда как другие виды, такие как голубокрылый

чирок (*Anas discors*) или чирок-свистунок (*Anas crecca*), могут представлять основные виды, в которых ВГП сезонно сохраняется (D.E. Stallknecht et al., 1990). Такой вид, как широконоска (*Anas clypeata*), который имеет уникальный характер питания, также может играть особую роль в поддержании ВГП благодаря стратегии кормления, которая характеризуется контактом с потенциально загрязненными ВГП донными отложениями (N.J. Hill et al., 2010). Кроме того, некоторые исследования показали, что процент содержания ВГП даже в пределах одного вида уток может зависеть от взаимодействия между субпопуляциями птиц различных географических регионов (например контакт местных и мигрирующих птиц) (P.J. Ferro et al., 2010; N.J. Hill et al., 2012(a); N.J. Hill et al., 2012(b); D.E. Stallknecht et al., 1990; J.G. Van Dijk et al., 2014; J.H. Verhagen et al., 2014(a)).

Что касается отряда ржанкообразные, то, как упоминалось ранее, в основном, два подтипа ВГП (Н13 и Н16) сохраняются у чайковых в гнездовых колониях, (A. Arnal et al., 2015; S.R. Fereidouni et al., 2009; V.S. Hinshaw et al., 1982) хотя изредка они выделяются от уток и куликов (J.H. Verhagen et al., 2014(b)). Вирусы гриппа подтипа Н13 выделяются от чаек в разное время года, что свидетельствует о том, что они из года в год сохраняются в популяциях этих птиц (I.L. Graves, 1992; N.S. Lewis et al., 2013). При этом, для вирусов гриппа подтипа Н16 подобная ситуация отмечена не была, но это, вероятно, связано с отсутствием необходимого количества данных.

Исследования ВГП, выделенных от птиц семейства бекасовые, не выявили генетических различий между ВГП куликов и уток (E. Spackman et al., 2005). Кроме того, среди видов этого семейства во всем мире показан низкий уровень инфицированности (J.M. Curran et al., 2014; N. Gaidet et al., 2012), и большинство случаев выделения ВГП во всем мире были связаны с одним видом – камнешарка (*Arenaria interpres*), в одном месте (залив Делавэр) и в одно время года (май и июнь) (A.M. Maxted et al., 2012; D.E. Stallknecht et al., 2012). Основываясь только на этих результатах мониторинга, трудно определить, является ли эта таксономическая группа (бекасовые) или даже

конкретный вид (камнешарка) существенной частью общего резервуара ВГП. Возможно, птицы этой группы являются лишь вторичными хозяевами вирусов, которые циркулируют среди уток и чаек (А.М. Maxted et al., 2012). Тем не менее, ежегодное выделение ВГП от камнешарки в заливе Делавэр может предоставить важную информацию о распространении этих вирусов на север во время сезонных миграций (S. Krauss et al., 2004).

Таким образом, спектр хозяев только частично определяется восприимчивостью отдельных видов. Также, случаи выделения и данные по восприимчивости видов к ВГП не могут определить, насколько важна роль отдельного вида в формировании общего резервуара. В настоящее время, по-видимому, существует ограниченное число видов птиц, которые способствуют сохранению и распространению ВГП в природе, но это может быстро измениться, если произойдут изменения природных или антропогенных условий, которые повысят потенциал для дальнейшего сохранения и циркуляции вирусов гриппа птиц.

## **1.8 Вирусы гриппа свиней**

Вирусы гриппа А являются основной причиной ежегодных острых респираторных заболеваний у свиней любого возраста. Зачастую, заболевания характеризуются легким течением с последующим выздоровлением животных (О.М. Radostits et al., 2000). Как и у людей, случаи заболевания гриппом у свиней регистрируются круглый год с сезонными подъемами заболеваемости, когда температура окружающей среды понижается (J. Shaman, M. Kohn, 2009).

Хотя признаки заболевания гриппом у свиней были впервые обнаружены во время пандемии гриппа в Испании в 1918 г. (J.S. Коен, 1919), первый случай выделения ВГА от свиней был зарегистрирован только в 1930 г. (R.E. Shope, 1931). Вирус гриппа A/swine/Iowa/15/1930 (H1N1) считается прототипом классического вируса гриппа свиней H1N1 (сH1N1), который постепенно эволюционировал в Северной Америке в течение 20 века до появления в 1998 году тройного реассортанта, так называемого TRIG (triple-

reassortant internal gene), содержащего гены внутренних белков вирусов гриппа птиц, человека и свиней (N. Zhou et al., 2000). С момента появления TRIG во всем мире резко увеличилось разнообразие ВГА у свиней, в результате чего было выделено несколько отдельных генетических и антигенных кластеров.

Эндемическими вариантами вируса гриппа у свиней преимущественно являются ВГА подтипов H1N1, H1N2 и H3N2, хотя, у свиней также регистрировались случаи инфицирования и другими подтипами ВГА, такими как H2N3, H3N1 и H4N1, имеющими происхождение от вирусов гриппа человека и птиц (Y. Hu et al., 2012; W. Ma et al., 2006; W. Ma et al., 2007; M.I. Nelson et al., 2014). Однако эти случаи являются спорадическими и вряд ли могут привести к тому, что эти вирусы также станут эндемичными у свиней.

Помимо этого, у свиней в Великобритании и Китае были обнаружены антитела к вирусам гриппа В, однако вирус гриппа В от свиней не выделялся. Также среди свиней зарегистрирована циркуляция вирусов гриппа С, однако случаев выделения данного типа вируса зарегистрировано немного (I.H. Brown et al., 1995; Y. Matsuzaki et al., 2002; E. Youzbashi et al., 1996). Этот вирус похож на вирус гриппа С человека и его циркуляция характерна в основном для крупного рогатого скота (B.M. Hause et al., 2014; Z. Sheng et al., 2014).

Клинические признаки заболевания, вызванного ВГА, как у зараженных естественным путем, так и у экспериментально инфицированных свиней, включают снижение веса, кашель, затрудненное дыхание, чихание, выделения из носа и снижение прироста веса. Повышение температуры является наиболее частым клиническим признаком и достигает максимума в течение 24–48 часов после заражения большинством штаммов ВГА. При экспериментальном заражении свиней вирусами гриппа человека и свиней клинические признаки могут проявиться через 1 день, 2 дня (D. Blaskovic et al., 1970) или через 3 дня после инфицирования (S.K. Jo et al., 2007; K. Jung, S. Chae, 2006; K. Jung et al., 2005) и совпадают со временем выявления живого вируса в назальных смывах. Клинические признаки начинают исчезать между 4 и 8 сутками после заражения (I.H. Brown et al., 1993; F. Naesebrouck et al.,

1985; F. Haesebrouck, M.B. Pensaert, 1986; P.P. Heinen et al., 2001(a); P.P. Heinen et al., 2001(b); P.P. Heinen et al., 2002; K. Jung, C. Chae, 2006; B.W. Lee et al., 1995; J.H. Lee et al., 2007; M.D. Macklin et al., 1998; Z. Pospisil et al., 1973; D. Sreta et al., 2009; K. Van Reeth et al., 2003; H.M. Weingartl et al., 2009). У предварительно иммунизированных животных после заражения антигенно подобным штаммом, снижается количество вируса в смывах, а выделение прекращается на 2–4 сутки (S.E. Detmer et al., 2013; P.P. Heinen et al., 2002, P.P. Heinen et al., 2001(b); K. Van Reeth et al., 2001(a); K. Van Reeth et al., 2003; K. Van Reeth et al., 2006). Применение гомологичных вакцин в идеале может привести к тому, что вирусы гриппа или клинические признаки заболевания не будут регистрировать, но стопроцентной гарантии все же нет (M. Allerson et al., 2013; A. Romagosa et al., 2011).

Грипп у свиней – это инфекция с высоким уровнем заболеваемости и низкой смертностью. Вирусы гриппа зачастую циркулируют на фермах без проявления клинических признаков (C. Corzo et al., 2013 (a)) и могут наблюдаться у 80–100% свиней на фермах, где раньше заболевание не регистрировалось, и у 30–50% свиней на эндемически инфицированных фермах. Смертность от неосложненного гриппа редко регистрируется у свиней. Гибель животных наблюдалась, например, в таких случаях, когда кашель приводил к образованию гематомы трахеи, которая вызывала асфиксию, а также когда анорексия приводила к кровоточащим язвам желудка и последующей гибели от кровопотери. Однако чаще всего смертность от гриппа у свиней обусловлена вторичной бактериальной инфекцией или сопутствующими инфекциями. Так, например, коинфекция вируса гриппа с бактерией *Haemophilus parasuis* или вирусом респираторно-репродуктивного синдрома свиней связана с более тяжелым течением заболевания у свиней (K. Van Reeth et al., 2001(b); K. Van Reeth et al., 1996). Было показано, что другой патоген комплекса респираторных заболеваний свиней (PRDC - porcine respiratory disease complex) - *Mycoplasma hyopneumoniae*, вызывает застойные явления в реснитчатом эпителии трахеи и бронхиального дерева и, таким

образом, нарушает механизм защиты слизистых оболочек (S. Yazawa et al., 2004). Один из наиболее вирулентных изолятов имел зарегистрированную смертность 10% среди свиней. Однако после анализа в легких были также обнаружены другие виды, такие как вирус респираторно-репродуктивного синдрома свиней, *Pasteurella multocida* и *Streptococcus suis* (W. Ma et al., 2010). Все эти патогены считаются частью PRDC (T. Opriessnig et al., 2011). И поскольку ВГА является одним из основных компонентов комплекса респираторных заболеваний свиней, клинические признаки PRDC аналогичны описанным для гриппа. Инфицирование патогенами PRDC характеризуется 30–70% заболеваемостью и 4–6% смертностью, аналогично как при инфицировании только вирусами гриппа (T. Opriessnig et al., 2011).

У свиней инкубационный период при инфекции вирусами гриппа довольно короткий. При экспериментальном интратрахеальном заражении дозой  $1 \times 10^{6-8}$  TCID<sub>50</sub>/мл или EID<sub>50</sub>/мл вирус обычно начинает выделяться из носа в титре  $10^{2-4}$  TCID<sub>50</sub>/мл в течение 24–48 часов (J.R. Ciacci Zanella et al., 2012; S.E. Detmer et al., 2013; A. Romagosa et al., 2011). Этот параметр немного различается, в зависимости от способности вируса инфицировать клетки, иммунного статуса животного и скорости репликации вируса *in vivo*. Хотя интратрахеальное заражение является наиболее эффективным для экспериментальных моделей, фактический путь проникновения вируса при естественной инфекции – через носоглотку, а затем по дыхательным путям в легкие. Этот путь показан экспериментально как при прямом контакте, так и при передаче по воздуху от инфицированных свиней (M.J. Allerson et al., 2013; S.L. Loving et al., 2013; A. Romagosa et al., 2011). В экспериментах по трансмиссивности, макро- и микроскопические поражения были схожи как у инфицированных свиней, так и у контактных (M.J. Allerson et al., 2013; A. Romagosa et al., 2011).

В естественных условиях распространение ВГА может происходить круглый год, и существует ряд факторов риска, которые способствуют передаче вируса и непрерывной циркуляции одного или нескольких ВГА на

свиноферме. Большие размеры поголовья свиней на ферме являются установленным фактором риска (С. Fablet et al., 2013; А. Mastin et al., 2011; Z. Poljak et al., 2008). Однако, одним из наиболее важных факторов риска, связанных с более высокими показателями выявления ВГА, является тип фермы. Так, например, на фермах репродукторного типа высока вероятность обнаружить ВГА в назальных мазках, если откормочные свиньи находятся рядом со стадом свиноматок. При таком типе производства обычно все возрастные группы свиней находятся в одном и том же отделении или корпусе фермы, хотя их и разделяют на несколько групп. Зачастую, молодняк содержат в одном помещении с взрослыми свиньями, что способствует распространению ВГА среди восприимчивого поголовья молодых поросят. На некоторых хозяйствах репродукторного типа свиней разделяют по возрастам для формирования более однородных групп. Однако, если свиньи отстают в развитии, их перемещают в группу более молодых свиней, чтобы обеспечить им больше времени для роста, прежде чем их отправят на убой. И это опять же способствует распространению ВГА среди молодняка (С.А. Corzo et al., 2014).

В другом типе ферм с законченным циклом содержания и смешанного типа, зачастую, свиньи всех возрастов размещаются в одном и том же помещении в одно время. Было показано, что такой вид содержания также связан с повышенным риском заражения ВГА (С. Fablet et al., 2013). Тем не менее, было показано, что риск распространения ВГА на таких фермах все же ниже, чем на фермах репродукторного типа (С.А. Corzo et al., 2014).

Условиями окружающей среды, способствующими аэрозольному распространению ВГА, являются низкая температура и низкая влажность (А.С. Lowen et al., 2007). По результатам исследований, ВГА обнаруживались в воздухе внутри и снаружи свинарников как при экспериментальном заражении животных (С.А. Corzo et al., 2013(b)), так и во время вспышек на ферме (С.А. Corzo et al., 2013(c)). Конечно, идеальная наружная температура и скорость ветра для эффективного аэрозольного распространения ВГА еще не рассчитана, но, по отдельным данным, вирус может быть обнаружен на

расстоянии до 2,1 км по направлению ветра от зараженных ферм (С.А. Corzo et al., 2014). Эти выводы подтверждают возможность распространения ВГА между фермами. В настоящее время имеются только редкие примеры случаев, когда штаммы ВГА распространялись между фермами, и единственной эпидемиологической связью с этим является их близкое соседство (S.E. Detmer et al., 2013).

К другим факторам риска, которым необходимо уделять особое внимание, относятся эффективность вакцины против вируса гриппа свиней, а также вакцинация и состояние здоровья людей, работающих со свиньями. Чаще всего вакцинируют свиноматок, которые передают материнские антитела поросятам в период отъема. Материнские антитела обычно исчезают в возрасте от 8 до 12 недель – это та возрастная категория животных, у которых наиболее часто во время мониторинга выявляется вирус гриппа (С.А. Corzo et al., 2013(a)).

В дополнение к вышеуказанным факторам риска, существуют и другие эпидемиологические проблемы – это географические различия вирусов гриппа, а также распространение вирусов посредством перемещения свиней (например, при торговле) (M.I. Nelson et al., 2011). Разнообразие вариантов ВГА, возникающее из-за антигенного сдвига и дрейфа, более заметно там, где плотность и объемы перемещения свиней высокие. Так, например, в США перемещения свиней сыграли существенную роль в формировании разнообразия вирусов гриппа свиней, обнаруженного на территории Среднего Запада, который является конечным пунктом сбыта и регионом с самой высокой плотностью свиней (M.I. Nelson et al., 2011). Непрерывный импорт свиней из других регионов США на территорию Среднего Запада привел к появлению множества генетически различных вариантов вируса, совместно циркулирующих и обменивающихся сегментами генома посредством реассортации (M.I. Nelson et al., 2011). В настоящее время выделено семь генетически и антигенно различных линий гемагглютинина - H1 $\alpha$ , H1 $\beta$ , H1 $\gamma$ , H1 $\delta$ 1, H1 $\delta$ 2, H1pdm09 и H3 (Т.К. Anderson et al., 2013; А. Lorusso et al., 2011).

При этом среди линии вируса подтипа Н3 выделено несколько различных антигенных групп (N.S. Lewis et al., 2014).

Зоонозная природа вируса гриппа играет ключевую роль в его эпидемиологии и эволюции. Передача сезонных ВГА от человека к свинье хорошо описана в литературе (M.I. Nelson et al., 2012; M.I. Nelson et al., 2014). По этой причине большое значение имеет оценка стратегий борьбы с вирусом для снижения таких рисков, когда люди являются источником инфекции для поголовья свиней. Так, например, наряду с вакцинами, которые, несомненно, снижают риск проявления клинических признаков и выделение вируса, для персонала свиноферм необходимо применять средства индивидуальной защиты для снижения риска передачи вирусов от человека к свинье и от свиньи к человеку. Также некоторые варианты ВГП иногда передаются свиньям из популяций домашних и диких птиц, поэтому особенно подвержены риску многовидовые фермы и свиньи, живущие на открытом воздухе (G.S. Freidl et al., 2014). Хотя большинство зарегистрированных случаев инфекции связаны с передачей вируса подтипа H1N1pdm09 от человека к свинье, другие варианты штаммов сезонного ВГА человека время от времени выделяются от свиней (M.I. Nelson et al., 2014). При этом, случаи передачи вируса от свиньи к человеку также время от времени документируются. Помимо подтипа H1N1pdm09, заболевание человека, вызванное вирусом гриппа свиней, обычно не обладают способностью к передаче от человека к человеку (A. Coman et al., 2014; G.C. Gray et al., 2007; W.S. Krueger et al., 2013). Таким образом, наибольший риск, который представляют эти вирусы, заключается в том, что они обеспечивают возможность рекомбинации между штаммами вируса гриппа человека и свиней. Пандемический вирус, возникший в 2009 году, который имел происхождение от свиней, является тому доказательством и это подчеркивает важность понимания и изучения патогенеза заболевания, распространения и эволюции ВГА как у людей, так и у свиней.

## 1.9 Распространение вирусов гриппа птиц

Как уже говорилось ранее, дикие водоплавающие птицы считаются естественным резервуаром ВГА (R.G. Webster et al., 1992; B. Olsen et al., 2006). Инфицирование этих видов-хозяев характеризуется не только низкой патогенностью, но также может протекать бессимптомно (R.G. Webster et al., 1992; B.C. Easterday et al., 1968; J.C. Downie, W.G. Laver, 1973; J.C. Downie et al., 1973; T. Kuiken, 2013). Было показано, что такое течение инфекции у перелетных птиц способствует распространению как НРАИ так ЛРАИ на большие расстояния В. (Olsen et al., 2006; E. Jourdain et al., 2010; J. Runstadler et al., 2013; J.D. Brown et al., 2008). При этом распространение различных линий ВГП отмечено по определенным миграционным маршрутам (рис. 7) (Т.Т-У. Lam et al., 2012; M. Scotch et al., 2014; H. Tian et al., 2015; L. Lu et al., 2014; J. Bahl et al., 2009; A.S. Gonzalez-Reiche et al., 2012). Это было подтверждено исследованиями, в которых применялось дистанционное зондирование и филогенетический анализ, которые показали, что распространение вирусов подтипа Н5N1 в Восточной Азии в 2003-2012 годах было связано с миграциями диких птиц (H. Tian et al., 2015).

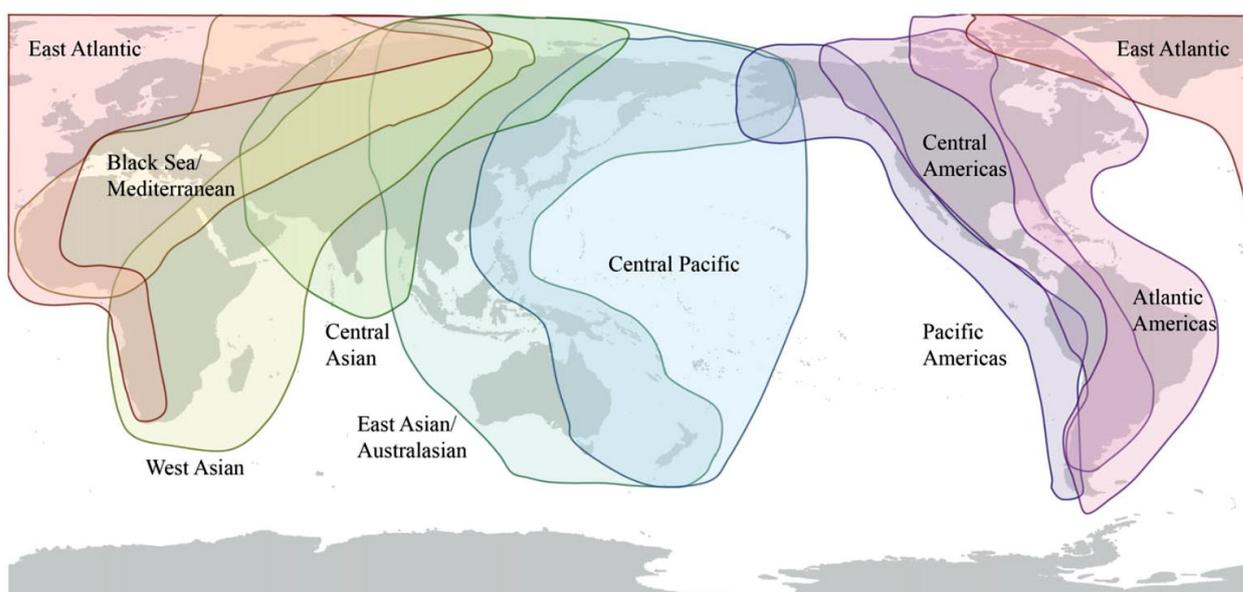


Рисунок 7. Основные миграционные маршруты диких птиц (S.J. Lycett et al., 2019)

Перенос вируса из одного географического региона в другой, а также его передача от одного вида-хозяина к другому может быть выявлена с помощью филодинамического и филогеографического анализа (P. Lemey et al., 2009; O.G. Pybus, A. Rambaut, 2009). Эти методы способствуют более широкому пониманию распространения ВГП, поскольку в этих методах используются данные последовательностей значительного количества вирусов. Так, например, филогеографический анализ выявил роль перелетных диких птиц во внутриконтинентальной циркуляции LPAI в Северной Америке (T.T-Y. Lam et al., 2012; M. Scotch et al., 2014; J. Vahl et al., 2013), а также показал перенос ВГП подтипа H7N3 из США в Мексику в 2012-2013 годах с дикими птицами, мигрирующими по североамериканскому пути (Lu et al., 2014). Аналогичным образом, филогеографические методы продемонстрировали распространение ВГП подтипа H5N1 различными видами птиц в Азии (N.S. Trovao et al., 2015), а также то, что распространение штаммов LPAI подтипа H9N2 в Азии связано не только с дикими птицами, которые способны переносить вирус на большие расстояния, но и с локальным распространением посредством торговли домашней птицей (J. Vahl et al., 2016).

Влияние миграционных путей птиц на глобальную циркуляцию ВГП можно увидеть при филогенетическом анализе всех сегментов генома, где можно наблюдать разделение на две совершенно разные крупные клады, соответствующие либо Америке, либо Азии, Европе, Африке и Австралии (рис. 5) (J. Vahl et al., 2009). Хотя принято считать, что распространение ВГП с дикими птицами происходит вдоль миграционных путей, различные виды имеют разные схемы миграции, и в некоторых местах эти миграционные пути пересекаются, способствуя внутриконтинентальной передаче ВГП с дикими птицами (J. Vahl et al., 2013). Также было показано, что такой вид как шилохвость (*Anas acuta*) способен к межконтинентальному переносу ВГП подтипа H5N8 по пересекающимся восточноазиатско-австралазийским и Тихоокеанским путям (A.V. Koehler et al., 2008). В 2014-2015гг. этим путем вирус был занесен в Северную Америку (S.J. Lycett et al., 2016; D-H. Lee et al.,

2015). Имеются также данные о заносе генов ВГП из Северной и Южной Америки в Евразию (S-H. Cheon et al., 2018). Тем не менее, даже если мигрирующие дикие птицы являются хорошими переносчиками ВГП, ряд исследований указывает на то, что циркуляция ВГП частично поддерживается за счет торговли инфицированными домашними птицами (J. Vahl et al., 2016; H. Chen et al., 2006; M. Gauthier-Clerc et al., 2007). Например, было установлено, что распространение НРАІ подтипа H5N1 на большие расстояния в 2004 году было вызвано перемещениями домашней птицы (M. Gauthier-Clerc et al., 2007), а также то, что циркуляция LРАІ и НРАІ в Китае обусловлены деятельностью человека (L. Lu et al., 2017). Таким образом, очевидно, что распространение вируса птиц во всем мире является результатом синергии между торговлей инфицированными домашними птицами и миграций диких птиц по пролетным путям (J. Vahl et al., 2016; A.M. Kilpatrick et al., 2006).

Считается, что новые штаммы НРАІ появляются из LРАІ после их проникновения в популяции домашних птиц (S. Krauss et al., 2015; R.S. Morris, R. Jackson, 2005). Так, например, домашние утки могут играть важную роль в появлении и распространении штаммов НРАІ, особенно в Азии (V. Martin et al., 2011; M. Gilbert, D.U. Pfeiffer, 2012; T.P. Van Boeckel et al., 2012). Зачастую они имеют ту же среду обитания, что и дикие водоплавающие птицы, поэтому домашних уток считают основными промежуточными хозяевами между дикими птицами и другими видами домашней птицы (J. Cappelle et al., 2014; V. Martin et al., 2011). Роль домашних уток в передаче ВГП между дикими птицами и домашними курообразными (*Galliformes*) была особо отмечена во время вспышек ВГП подтипа H7N9 в Китае (Т.Т-У. Lam et al., 2013), особенно в районах озер Поян и Донтинг, где наблюдается высокая концентрация свободно пасущихся уток, тесно контактирующих с потенциально инфицированными дикими птицами (J. Cappelle et al., 2014). Сельскохозяйственные методы, такие как выпуск большого количества молодых уток на рисовые поля до прибытия диких птиц, могут еще больше

усугубить передачу и циркуляцию вируса между дикими и домашними животными.

### **1.10 Высокпатогенный вирус гриппа птиц**

В настоящее время только штаммы вируса гриппа птиц подтипов H5 и H7 классифицируются как высокпатогенные на основании их способности вызывать заболевание со смертельным исходом у кур (ОИЕ, 2018). Более 20 лет назад филогенетический анализ последовательностей HA показал, что разные штаммы HPAI независимо эволюционировали от предшествующих вирусам LPAI (C. Rohm et al., 1995). Впоследствии это было подтверждено множеством исследований последовательностей вирусов гриппа, вызывавших вспышки, где были идентифицированы прямые предшественники высокпатогенных вирусов и выяснено их происхождение вплоть до конкретных птичников (I. Monne et al., 2014; A.H. Seekings et al., 2018). Так, в одной из работ был осуществлен мета-анализ вспышек H5 и H7 с 1959 по 2015 годы, который выявил 39 независимых случаев перехода LPAI в HPAI (M.S. Dhingra et al., 2018), из которых большинство (37 из 39) были связаны с коммерческим птицеводством.

Поскольку инфекция HPAI у домашней птицы имеет быстрое течение и высокий уровень смертности, вспышки на фермах зачастую бывают кратковременными, отчасти потому, что наибольший процент птиц погибает в течение нескольких дней. Вспышки HPAI подлежат обязательной регистрации, а также принятию обязательных мер контроля по распространению вируса в соседние регионы, которые включают выбраковку и уничтожение оставшегося поголовья птицы и запрет на передвижение продукции (ОИЕ, 2018). Тем не менее, в некоторых примечательных случаях вспышки HPAI характеризовались широким распространением и приводили к значительным потерям среди домашних птиц (D.J. Alexander, I.H. Brown, 2009).

Помимо широко распространенных вирусов НРАІ подтипа Н5, которые появились в Азии с 1996 года, а также распространившихся позже вирусов гриппа подтипа Н7, которые будут описаны далее, к другим вспышкам, которые приводили к серьезным последствиям (например, к гибели или уничтожению более 1 миллиона голов птицы), можно отнести вспышки в Пенсильвании, США в 1983г. и в Мексике в 1994г., вызванные вирусами гриппа подтипа Н5Н2 (W.J. Bean et al., 1985; T. Horimoto et al., 1995), вспышку в Италии в 1999г. (Н7Н1) (I. Capua et al., 2000), в Нидерландах в 2003г. (Н7Н7) (A. Stegeman et al., 2004), а также в Канаде в 2004г. (Н7Н3) (V.A. Bowes, 2007).

### **1.10.1 Появление и распространение высокопатогенного вируса гриппа подтипа Н5Н1 (1996-2009)**

В 1996 году от домашних гусей, выращиваемых в провинции Гуандун, Китай, был выделен вирус НРАІ А/Goose/Guangdong/1/96 (Н5Н1), который, как показали исследования, имел происхождение от вирусов гриппа подтипа Н5, циркулировавших среди диких перелетных птиц (L. Duan et al., 2007). Штаммы линии Goose/Guangdong (Gs/Gd) вызвали вспышки НРАІ Н5Н1 на птицефабриках в Гонконге в 1997 году и стали причиной случаев летальной инфекции среди людей (K.Y. Yuen et al., 1998; J.C. de Jong et al., 1997; E.C. Claas et al., 1998(a); E.C. Claas et al., 1998(b); K. Subbarao et al., 1998; P.K.S. Chan, 2002). Мониторинг на рынках живой птицы выявил, что вирус Н5Н1 был широко распространен среди домашней птицы (K.F. Shortridge et al., 1998; K.F. Shortridge, 1999), и впоследствии, после оценки зоонозного риска, зимой 1997-1998 года вся сельскохозяйственная птица в Гонконге была забита (K.F. Shortridge, 1999).

Эта крайняя мера имела частичный успех, потому что линия «НК-97» вирусов НРАІ Н5Н1 была окончательно искоренена в Гонконге (L. Duan et al., 2008). Однако в 2001 г. вновь появились Gs/Gd-подобные вирусы Н5Н1 (H. Chen et al., 2006; L. Duan et al., 2008; Y. Guan et al., 2002; K.S. Li et al., 2004). Филогенетические исследования этих вирусов показали, что в период 1996–

2002гг. в результате реассортации между вирусами НРАІ Н5N1 и штаммами LРАІ, циркулирующими как в популяциях домашних, так и среди диких птиц, возникли несколько различных генотипов Н5N1 (Н. Chen et al., 2006; L. Duan et al., 2008; Y. Guan et al., 2002; K.S. Li et al., 2004). К 2003 году один генотип (Z) стал доминирующим (K.S. Li et al., 2004) и помимо новых случаев заболевания людей в Гонконге в 2003 году, его представители вызвали вспышки НРАІ в материковом Китае и других странах Юго-Восточной и Восточной Азии (ВНО, 2014). С этими вспышками среди домашней птицы были связаны случаи заболевания и гибели людей во Вьетнаме, Таиланде и Китае (ВНО, 2018).

Весной 2005 года на озере Цинхай в западной части Китая была зарегистрирована массовая гибель диких птиц, преобладающим видом среди которых был горный гусь (*Anser indicus*). Эти птицы были инфицированы смесью двух ранее идентифицированных генотипов НРАІ Н5N1 (V и Z) (Н. Chen et al., 2005). Считалось, что вирус, вызвавший эту вспышку, скорее всего, имел происхождение от домашней птицы на юге Китая, и был занесен перелетными птицами на озеро Цинхай (Н. Chen et al., 2005; Н. Chen et al., 2006; J. Liu et al., 2005). Этот случай вызвал особую обеспокоенность, поскольку показал, что вирус НРАІ может циркулировать в популяциях диких мигрирующих птиц и впоследствии распространиться по всей Азии или в Европу (J. Liu et al., 2005). Кроме того, вирус содержал мутацию 627К в полимеразном белке PB2, которая, как было показано, повышает вирулентность вирусов Н5N1 для млекопитающих (мышей) (K. Shinya et al., 2004).

В итоге, с 2005 по 2006 год НРАІ Н5N1 распространился из Юго-Восточной Азии в Европу, Средиземноморье и Африку (S.L. Salzberg et al., 2007). В июле 2005 г. в России и Казахстане стали появляться первые сообщения о вспышках среди птиц. Затем, в октябре 2005 года вспышки регистрировались в Турции, Румынии и Хорватии. В ноябре 2005 года в Кувейте от мигрирующего фламинго был выделен вирус гриппа подтипа

H5N1 (WHO, 2014), а к февралю 2006 года из Ирака и Ирана поступили сообщения о вспышках среди домашних и диких птиц, кошек, а также инфицировании людей (S.L. Yingst et al., 2006). В январе и феврале 2006 г. были зарегистрированы первые случаи выделения НРАИ H5N1 в странах Южной и Западной Европы (WHO, 2014). В Африке вирус H5N1 впервые был зарегистрирован среди домашней птицы в Нигерии в феврале 2006 года, за этим последовали сообщения о вспышках птичьего гриппа в Египте (S.L. Salzberg et al., 2007; I. Monne et al., 2008; K. Huang et al., 2012; M.F. Ducatez et al., 2007). С 2006 по 2007 год вирус продолжал распространяться на севере и западе Африки, в Европе, а также на Ближнем Востоке и Юго-Восточной Азии.

В связи с распространением вируса H5N1 за пределы Азии, был поднят вопрос о возможном прототипном штамме следующей пандемии гриппа (R.J. Webby, R.G. Webster, 2003; WHO, 2005). Эти опасения подкреплялись тем, что к началу 2009 года H5N1 был эндемичным в Юго-Восточной Азии, распространился по Евразии и Африке, вызывая вспышки среди домашних птиц. Распространение H5N1 привело к нескольким сотням случаев заболевания и гибели людей, при этом уровень смертности от инфекции находился в пределах 30–80% в зависимости от страны (WHO, 2018). Впоследствии даже появилась информация о возможной передаче вируса гриппа H5N1 от человека к человеку (K. Ungchusak et al., 2005; H. Wang et al., 2008). К счастью, в 2009 году вирус гриппа H5N1 не вызвал пандемию, которая могла привести к гибели миллионов людей, в случае если, передаваясь от человека к человеку, вирус сохранил бы высокую патогенность. Вместо этого в 2009 году мир был охвачен другой, но гораздо более мягкой пандемией, вызванной вирусом гриппа подтипа H1N1 (G.J.D. Smith et al., 2009; Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, 2009). Учитывая среднюю тяжесть заболевания людей и отсутствие иммунитета к этому новому штамму, отличавшемуся антигенно от ранее циркулирующего сезонного вируса H1N1, стало очевидно, что значительная часть населения планеты,

вероятно, была инфицирована вирусом H1N1pdm09. На это указывают обобщенные данные серологических исследований из 19 стран, которые выявили серопозитивные случаи у четверти населения попавших под исследования государств (M.D. Van Kerkhove et al., 2013), при этом, по некоторым оценкам, количество летальных случаев в первый год составляло от 151 тысячи до 575 тысяч человек (F.S. Dawood et al., 2012). Пандемический штамм вируса гриппа H1N1pdm09 впоследствии полностью вытеснил циркулировавший ранее сезонный вирус гриппа человека H1N1 и теперь циркулирует в популяции людей вместе с сезонными вирусами гриппа подтипа H3N2 и вирусом гриппа В.

### **1.10.2 Эволюция вирусов гриппа подтипа H5 (2009-2018)**

С ростом числа зарегистрированных вспышек среди домашней птицы и случаев заболевания людей, рабочая группа ВОЗ/ОИЕ/FAO по эволюции ВГА H5N1 установила специальную систему номенклатуры, которая распределяла вирусы гриппа подтипа H5 на клады, которые были обозначены как клада 1, клада 2 и т.д. (WHO/OIE/FAO, 2008, 2009, 2011, 2014). Критерии в основном включают следующие три требования:

1. Вирусы должны иметь общий узел на филогенетическом дереве.
2. Узел монофилетической группы, определяющий кладу, должен иметь бутстреп-поддержку  $\geq 60$  при 1000 повторах и использованием метода присоединения соседа (neighbor joining).
3. Средний процент разброса генетических дистанций между и в пределах клад должен быть  $>1,5\%$  и  $<1,5\%$  соответственно.

С момента своего первого обнаружения в 1996 году линия Gs/Gd вирусов HPAI H5N1 подверглась реассортации сегментов генома, кодирующих внутренние белки, что впоследствии привело к разделению гена H5 на десять отдельных клад (WHO/OIE/FAO, 2012; G.J.D. Smith, R.O. Donis, 2015). Клада 0, которая в основном состоит из вирусов-предшественников гриппа H5, наиболее близка к линии Gs/Gd (M. Gu et al., 2013; G. Neumann et

al., 2010). Большинство вирусов этой клады были обнаружены в Гонконге и Китае в 1996 году. Впоследствии, когда вирусы подверглись нуклеотидной дивергенции и стали относиться к другой монофилетической группе, сами клады начали расщепляться. В ходе такой эволюции появились клады второго порядка, а при достижении определенного уровня генетического разнообразия могут формироваться клады третьего порядка (G. Neumann et al., 2010). В период с 2001 по 2006 год было выделено четыре клады вирусов H5, затем вирусное разнообразие привело к выделению 10 различных клад (0–9). Позднее, в 2006 году, клада 2 была расширена до пяти клад второго порядка и ее стали выделять отдельно, поскольку она значительно расширилась из-за большого количества изолятов (G. Neumann et al., 2010). Так, к кладе 2.1 были отнесены вирусы, которые циркулировали среди птиц, а также выделялись от людей с 2003 по 2007 год в Индонезии. Клада 2.2 была представлена вирусами, выделенными от птиц и людей в Восточной и Западной Европе, Ближнем Востоке и Африке, включая вспышки, которые регистрировались на озере Цинхай в Китае и Монголии с 2005 до 2007 года (M. Gu et al., 2013; G. Neumann et al., 2010; M. Ducatez et al., 2017). Представители клады 2.3 включают ВГП линии Gs/Gd, которые были причиной вспышек среди птиц, а также случаев заражения людей в Китае, Гонконге, Вьетнаме, Таиланде, Лаосе и Малайзии с 2003 по 2006 год (M. Ducatez et al., 2017). В кладу 2.4 отнесены вирусы гриппа, которые циркулировали в провинциях Юньнань и Гуанси на юго-востоке Китая с 2002 по 2005 год (WHO/OIE/FAO, 2014). Наконец, клада 2.5 включает штаммы ВГП, циркулировавшие в Корее, Японии и Китае с 2003 по 2004 год, а также вирусы, выявленные в округе Шаньтоу, Китай, в 2006 году (WHO/OIE/FAO, 2014; M. Gu et al., 2013; G. Neumann et al., 2010). Расщепление клад продолжилось, когда вирус распространился по Центральной Азии, на Ближний Восток и в Африку в 2007 году. К 2008 году клады второго порядка расширились до клад третьего порядка и были выделены клады 2.1.1–2.3.4 (M. Gu et al., 2013). Следует отметить, что за периодом, характеризовавшимся таким разнообразием, последовал период (с 2009 по 2013 год), за который

было зарегистрировано небольшое количество вспышек (M.S. Dhingra et al., 2016). В течение этого периода, скорее всего, происходила реассортация вирусов HPAI H5N1 клады 2.3.4 с другими вирусами гриппа, что привело к их широкому географическому распространению (M.S. Dhingra et al., 2016; N.J. Hill et al., 2017; G. Neumann et al., 2010). К 2011 году клады первого, второго и третьего порядка были расширены с появлением дополнительных клад второго, третьего и четвертого порядков (WHO/OIE/FAO, 2009, 2011, 2014). Наряду с расширением этих клад, ранее циркулировавшие клады вирусов гриппа H5N1 не регистрировались и не выявлялись в течение нескольких лет. Так, с 2008 года вирусы гриппа, принадлежащие к кладам 0, 2.1.1, 2.1.2, 2.3.1, 2.3.3, 2.4, 2.6, 3, 4, 5, 6, 8 и 9 не выявлялись (рис. 7).

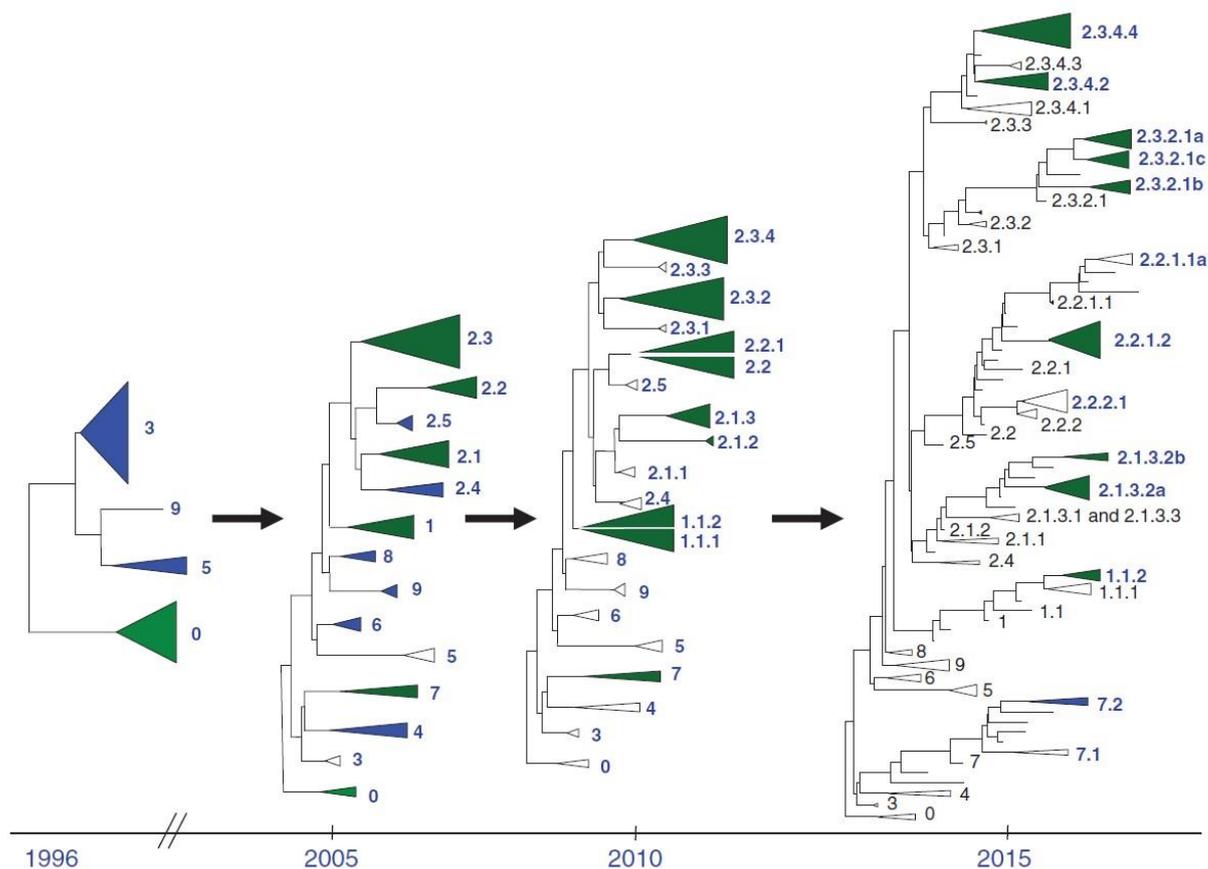


Рисунок 7. Филогенетическое дерево гена НА вирусов гриппа H5. Синим выделены клады, включающие вирусы, выделенные от человека, зеленым – вирусы, выделенные от птиц. Исчезнувшие из циркуляции клады без цветового выделения (S.J. Lycett et al., 2019)

Эти вирусы, скорее всего, были вытеснены вирусами новых клад и, возможно, окончательно исчезли из циркуляции (Т. Saito et al., 2015).

С 2008 года вирусы HPAI H5N1 подвергались частой реассортации с LPAI вирусами, что привело к появлению в кладе 2.3.4.4 вирусов подтипов H5N2, H5N5, H5N6 и H5N8. В настоящее время эти вирусы известны под общим названием – вирусы гриппа H5Nx (G.J.D. Smith, R.O. Donis, 2015). С 2009 года вирусы H5Nx много раз выявлялись на птицефабриках и на рынках живой птицы в ходе мониторинга вируса гриппа на территории Китая (М. Gu et al., 2011; G. Zhao et al., 2012; K. Zhao et al., 2013; W. Zou et al., 2012). Изначально более распространенными были вирусы гриппа подтипа H5N5 (М. Gu et al., 2011; С.Г. Liu et al., 2013), в то время как подтип H5N8, по-видимому, был менее распространен среди домашних уток. Штамм A/duck/Jiangsu/k1203/2010 (H5N8) был впервые обнаружен в восточном Китае только в 2010 году и в последующие два года циркуляции H5N8 отмечено не было (K. Zhao et al., 2013). В 2013 году вирусы гриппа H5N8 вновь появились в восточном Китае. Так, от дикой кряквы был выделен штамм A/mallard duck/Shanghai/SH-9/2013 (H5N8), который содержал гены внутренних белков от штаммов ВГА H5N1 (Н. Wu et al., 2014; S. Fan et al., 2014), а также в 2013–2014 гг ВГА H5N8 обнаруживались у здоровых уток и гусей на рынке живой птицы в провинции Гуандун, южный Китай (Y. Song et al., 2015). В январе 2014 г. вспышки, вызванные ВГА H5N8 были зарегистрированы в Южной Корее (Y-J. Lee et al., 2014). Эти вирусы имели высокое сходство со штаммом A/duck/Jiangsu/k1203/2010 (H5N8) по сегментам HA и NA, но имели гены внутренних белков, по крайней мере, от двух разных линий ВГА, циркулировавших в восточном Китае (Y-J. Lee et al., 2014; J. Jeong et al., 2014). Из проведенного детального филогеографического анализа было сделано заключение, что ВГА H5N8 проник в Южную Корею с дикими водоплавающими птицами, которые впоследствии заразили домашних уток (S.C. Hill et al., 2015; J. Jeong et al., 2014).

### **1.10.3 Распространение вирусов кланды 2.3.4.4**

#### **1.10.3.1 Вирус гриппа H5N5**

Среди домашних птиц утки считаются основным резервуаром, в котором осуществляются процессы реассортации большинства вирусов гриппа птиц (К. Zhao et al., 2013; М. Gu et al., 2011). Кроме того, широко распространенные рынки живой птицы в Китае способствуют ускорению этих процессов между различными вариантами ВГП (Y. Bi et al., 2016 (a); Y. Kang et al., 2017; H. Wu et al., 2014). Сочетание этих двух факторов внесло значительный вклад в появление первого вируса H5Nx (C.G. Liu et al., 2013; К. Zhao et al., 2013; W. Zou et al., 2012; М. Gu et al., 2011). Так, в конце 2008 года в Китае был выделен первый вирус подтипа H5N5 (К. Zhao et al., 2013; М. Gu et al., 2011).

Данный подтип вируса был выделен от здоровых крякв (*Anas platyrhynchos*) в ходе мониторинга ВГП на рынках, где реализуется живая птица (C.G. Liu et al., 2013; К. Zhao et al., 2013; W. Zou et al., 2012; М. Gu et al., 2011; A. Fusaro et al., 2017; Q. Li et al., 2015). В восточной части Китая было выделено два штамма ВГА – A/Duck/Eastern/China/008/2008 (H5N5) и A/Duck/Eastern/China/031/2009 (H5N5) (C.G. Liu et al., 2013). В это же время было выявлено еще три изолята ВГП H5N5, которые были выделены от уток в провинции Гуандун (C.G. Liu et al., 2013; К. Zhao et al., 2013). В 2010 году еще один случай выделения данного подтипа от уток был зафиксирован в Центральном Китае (W. Zou et al., 2012). Существует несколько теорий происхождения ВГП H5N5. По одной из гипотез, вирусы H5N5 возникли в ходе реассортации штаммов A/duck/Eastern-China/108/2008 (H5N1), A/duck/Eastern-China/909/2009 (H5N1) и A/duck/Yangzhou/013/2008 (H6N5). По другой версии, вирусы H5N5 появились в результате реассортации евразийской линии H5N1, какого-то неопределенного подтипа и вируса гриппа H6N5 (М. Gu et al., 2011). И, наконец, есть предположение, что вирусы H5N5 появились в результате реассортации вирусов гриппа H10N5 и H5N1,

которые циркулировали в Китае с 1983 и с 1997 года соответственно, и с другими циркулировавшими в Китае ВГП (W. Zou et al., 2012).

Несмотря на то, что первым представителем вирусов H5Nx стал подтип H5N5, с момента его появления зафиксировано всего несколько случаев выделения ВГП H5N5 клады 2.3.4.4. При этом, не было зарегистрировано ни случаев заражения людей, ни массовых вспышек, вызванных этим вирусом (C.G. Liu et al., 2013). Так, в течение 2016–2017, помимо случаев выявления H5N5 в Китае, имеются данные о 18 зарегистрированных случаях выделения этого вируса в 11 европейских странах, а именно: во Франции, Италии, Черногории, Хорватии, Польше, Чешской Республике, Греции, Германии, Сербии, Словении и Нидерландах (FAO, 2017; APHA, 2016; FAO, 2019).

### **1.10.3.2 Вирус гриппа H5N8**

В ходе масштабного мониторинга ВГП на рынках живой птицы, а также на фермах восточного Китая в 2010 году, наряду с тремя штаммами ВГА H5N5, впервые был выделен новый вариант ВГА подтипа H5N8 (штамм A/duck/Jiangsu/k1203/2010) (K. Zhao et al., 2013). Было показано, что пять генов внутренних белков (PB1, PB2, PA, M и NS) этого вируса имеют высокую степень идентичности с генами вирусов гриппа H5N1, выделенных в восточном Китае с 2005 по 2006 год (K. Zhao et al., 2013). При этом, ген NP H5N8 имел высокое сходство последовательностей с геном NP вирусов гриппа H6N2, выделенных на территории провинции Гуандун в период 2001–2003 г. Таким образом, можно предположить, что H5 NPAI, несущий ген N8, возможно, имел происхождение из Китая (L.C. Zhou et al., 2016).

Помимо этого, в результате филогенетического анализа последовательностей генов HA и NA первого изолята H5N8, было показано, что реассортация, скорее всего, произошла в августе 2009 г. (L. Ma et al., 2018). Наиболее вероятно, что обмен генами произошел между штаммами HPAI H5Nx домашней птицы и штаммами HxN8, циркулирующими среди дикой водоплавающей птицы (L. Ma et al., 2018; L.C. Zhou et al., 2016). Скорее всего,

донором нейраминидазы был один из наиболее распространенных в 2009 году в Китае вирус H3N8 (L. Ma et al., 2018; K. Zhao et al., 2013). Таким образом, было высказано предположение, что результат обмена вирусом между домашней и дикой птицей, вероятно, стал причиной появления нового вируса H5N8 (L. Ma et al., 2018).

Вирус H5N8 был впервые выделен от клинически здоровых уток (*Anas platyrhynchos*) в провинции Цзянсу (S. Fan et al., 2014; L. Ma et al., 2018; K. Zhao et al., 2013) и до 2013 года в Китае не было зарегистрировано ни одной вспышки, вызванной ВГА H5N8. Распространяться за пределы Китая вирус начал в 2014 году. Так, в Республике Корея с января 2014 г. по июль 2015 г. регистрировались вспышки, вызванные вирусом H5N8, среди домашней и дикой птицы. Выявленный в Корее H5N8 показал высокую степень идентичности с вирусом, который был выделен в ходе мониторинга ВГП на рынках живой птицы в Китае (L. Ma et al., 2018). Также, в апреле 2014 г. вспышка H5N8 была зафиксирована в Японии (FAO, 2017). В конце 2014 года вирус продолжил распространяться и достиг Европейской территории. К началу 2015 года вспышки, вызванные вирусом H5N8, были документированы в шести европейских странах – Германии, Венгрии, Италии, Нидерландах, Швеции и Великобритании (D.H. Lee et al., 2017; FAO, 2017; R. El-Shesheny et al., 2017). Причем, распространение НРАIV H5N8 из Азии в Европу связывали с рядом факторов, таких как транспортировка сельскохозяйственной продукции и миграции диких птиц (C. Adlhoch et al., 2014). Таким образом, было отмечено первое проникновение вирусов линии Gs/GD клады 2.3.4.4 в Европу (FAO, 2017; A. Globig et al., 2017).

Вирусы гриппа подтипа H5N8 клады 2.3.4.4 разделились на две генетические линии, которые получили названия «Вуан-подобные» или «Gochang- подобные» (FAO, 2017; D.H. Lee et al., 2016). К Вуан- подобным вирусам H5N8, или вирусам Группы А, относят вирусы, которые были впервые выделены в некоторых азиатских странах, а также в Европе в 2014 году. Предшественники этих вирусов были первоначально обнаружены в

восточном Китае до их межконтинентального распространения (FAO, 2017; K. Zhao et al., 2013; D.H. Lee et al., 2016; Y.I. Kim et al., 2017).

В 2016 году была зарегистрирована вторая волна распространения вирусов H5N8. Вновь появившуюся группу H5N8 называли Gochang-подобными вирусами (FAO, 2017). Новый реассортант H5N8 был выявлен среди диких птиц в провинции Цинхай, Китай, в мае 2016 года. Впоследствии вирусы данной группы также распространились на другие континенты (D.H. Lee et al., 2017; R. El-Shesheny et al., 2017; M. Li et al., 2017). Было показано, что эта группа вирусов отличается от HPAI H5N8, который циркулировал в Европе в 2014 году (D.H. Lee et al., 2016). При этом, новая группа вирусов имела три из восьми генов, как и в случае реассортации H5N1-подобных вирусов. Новый H5N8 являлся продуктом реассортации LPAI вирусов евразийской линии по генам PB2, PB1, PA, NP, M и HPAI H5N8 вирусов по генам HA, NS1, NS2 (D.H. Lee et al., 2017).

Появившийся в 2016 году новый вариант H5N8 распространился более масштабно и стал причиной массовых эпизоотий среди домашних птиц, а также широкого круга диких, по меньшей мере, в 49 странах (FAO, 2017; FAO, 2019). С 2016 по 2018 гг. данный вирус продолжал циркулировать и распространяться, в том числе с миграциями диких птиц, в странах Европы, Азии и Африки (M.S. Dhingra et al., 2016; FAO, 2017; R. Bodewes, T. Kuiken, 2018; R. El-Shesheny et al., 2017; FAO, 2019). Благодаря предпринятым карантинным мерам, ограничению торговли птицей, количество вспышек, вызванных вирусом гриппа H5N8 клады 2.3.4.4, постепенно стало уменьшаться. Тем не менее, даже при введении таких комплексных мер борьбы с вирусом, H5N8 в Азии, особенно в Китае, до сих пор сохраняется и циркулирует (M.S. Dhingra et al., 2016; F. Claes et al., 2016; W. Xu et al., 2017; S. Fan et al., 2014; L. Ma et al., 2018; Y. Song et al., 2015; K. Zhao et al., 2013; L. C. Zhou et al., 2016; H. Wu et al., 2014; M. Li et al., 2017; Y.I. Kim et al., 2014; J.H. Verhagen et al., 2015).

В общей сложности, с 2013 по 2018 год в мире было отмечено около 3500 вспышек, вызванных НРАІ Н5N8 (FAO, 2019). При этом, на сегодняшний день не зарегистрировано ни одного случая заражения человека данным подтипом ВГА, однако продолжающееся распространение этого вируса до сих пор вызывает беспокойство. Циркуляция вируса Н5N8 среди домашней и дикой птицы породила новые реассортанты, которые распространились по всему миру (S. Fan et al., 2014; L. Ma et al., 2018; Y. Song et al., 2015; H. Wu et al., 2014). Более того, в процессе адаптации вируса к новым хозяевам, сформировались аминокислотные замены, которые облегчают передачу вируса от одного хозяина к другому (L. Ma et al., 2018). Также, имеются данные о наличии мутаций в геноме, которые отвечают за адаптацию вируса к млекопитающим. Было показано, что адаптированный к мышам вирус имеет повышенную вирулентность, что представляет дополнительную угрозу общественному здравоохранению (W.S. Choi et al., 2017).

### **1.10.3.3 Вирус гриппа Н5N6**

После появления вирусов гриппа Н5N5 клада 2.3.4.4 существенно расширилась. Среди диких и домашних птиц стали циркулировать варианты ВГП с подтипами нейраминидазы N2, N5, N6 и N8 (N. Takemae et al., 2017). Распространение вирусов Н5Nx началось после того, как в июле 2008 года вирус Н5N5 из провинции Гуандун (штамм A/duck/Guangdong/wy19/2008 (Н5N5)) был занесен в северо-восточную провинцию Цзянсу, где вызвал вспышку среди диких птиц (Y. Bi et al., 2016(b); Y. Kang et al., 2017). К 2010 году стало ясно, что провинция Цзянсу стала ключевым регионом, откуда вирусы гриппа птиц распространялись в северную и южную части Китая (Y. Bi et al., 2016(b)). Миграции диких птиц внутри Китая и их контакты с домашними птицами привели к появлению высокопатогенного ВГП подтипа Н5N6 (Y. Bi et al., 2016(a); L. Yang et al., 2017; Y. Kang et al., 2017; N. Takemae et al., 2017; V. Joob et al., 2015). В то время Китайское правительство усилило мониторинговые исследования вируса гриппа, в ходе которых было

установлено, что ВГП H5N6 доминируют среди прочих подтипов НРАI и распространяются по всей стране (Y. Bi et al., 2016(a)). В итоге, вирусы гриппа H5N6 смогли преодолеть межвидовой барьер и стали причиной гибели людей в Китае (Y. Bi et al., 2016(a); L. Yang et al., 2017; Y. Kang et al., 2017; N. Takemae et al., 2017; B. Joob et al., 2015). На сегодняшний день НРАI H5N6 является одним из немногих подтипов ВГП, которые способны инфицировать человека (H.D. Thanh et al., 2018).

Исследования показали, что вирус H5N6 произошел от общего штамма-предшественника клады 2.3.4.4 подтипа H5 в результате реассортации со штаммом A/duck/Guangxi/2281/2007 (H6N6) (Y. Bi et al., 2016(a); Y. Bi et al., 2016(b); H.D. Thanh et al., 2018; N. Takemae et al., 2017). Однако есть данные о том, что происхождение вирусов H5N6, возможно, шло другими эволюционными путями (L. Yang et al., 2017). По одной из гипотез, данный вирус появился в период с 2010 по 2012 год в результате реассортации вируса H5N2 клады 2.3.4.4 со штаммом A/duck/Guangxi/2281/2007 (H6N6) с последующей реассортацией по шести генам внутренних белков с вирусом гриппа H5N1 клады 2.3.2.1c, выделенным от кур (L. Yang et al., 2017). Вирус H5N6, так называемый «реассортант А», развившийся по такому пути, циркулирует в Синьцзяне, Цилине и северном Китае (Y. Bi et al., 2016(a); Y. Bi et al., 2016(b); H. Yang et al., 2016). В 2013 году этот вирус распространился в западную часть Китая, где вызывал вспышки в провинции Сычуань, а также соседних странах, таких как Вьетнам и Лаос (M.S. Dhingra et al., 2016; H.D. Thanh et al., 2018).

Другой вариант вируса гриппа H5N6, который назвали «реассортант В» появился в 2013 году в результате реассортации вирусов H6N6, у которых была выявлена делеция в области стебля нейраминидазы, с вирусами H5N8 клады 2.3.4.4 и последующей реассортации с вирусами H5N1 клады 2.3.2.1c (L. Yang et al., 2017). Такой вариант вируса также циркулировал в Китае, Вьетнаме и Лаосе. Через два года реассортант В подвергся повторной реассортации со штаммом вируса гриппа подтипа H9N2, в результате чего

появился новый вариант вируса H5N6 – «Реассортант С». Циркуляция этого варианта была зарегистрирована в провинциях Юньнань и Гуандун в Китае (H. Yang et al., 2016; L. Yang et al., 2017).

Вне зависимости от того, каким эволюционным путем возникали эти реассортанты, известно, что все они вызывали инфекционные заболевания людей (Y. Bi et al., 2016(a); Y. Bi et al., 2016(b); L. Yang et al., 2017). На сегодняшний день зарегистрировано 26 случаев заражения человека НРАІ вирусом подтипа H5N6. Надо отметить, что все случаи были зарегистрированы только в Китае (FAO, 2019). Большинство случаев заболевания людей связано с вариантами А или В. Однако первый случай инфицирования человека H5N6 в 2014 году был вызван реассортантом А вируса гриппа H5N6 (L. Yang et al., 2017; B. Joob et al., 2015). Что касается варианта С, то выявлено, что данный вариант вируса обладает меньшей вирулентностью по сравнению с реассортантами А и В (L. Yang et al., 2017).

На сегодняшний день циркуляция H5N6 ограничена Азией и Европой. В 2014 году H5N6 распространился по Лаосу и Вьетнаму, что привело к огромным экономическим потерям из-за вспышек инфекции среди домашней птицы (FAO, 2019). В 2016 году H5N6 стал причиной нескольких вспышек в других странах Азии. Гибель домашней птицы регистрировалась в Японии, Мьянме и Республике Корея (Y. Bi et al., 2016(b); FAO, 2019). В 2017 году вспышки, вызванные ВГП H5N6, были отмечены в Тайвани и на Филиппинах. Кроме того, с дикими перелетными птицами в это время НРАІ H5N6 был занесен в Европу. Вспышки, вызванные этим вирусом, были зафиксированы в таких странах как Греция, Германия, Нидерланды и Швейцария (Y. Bi et al., 2016(a); Y. Bi et al., 2016(b); L. Yang et al., 2017; Y. Kang et al., 2017; N. Takemae et al., 2017).

#### **1.10.3.4 Вирус гриппа H5N2**

В ходе мониторинга вируса гриппа на рынках живой птицы в восточном Китае в 2011 году от здоровых особей домашних птиц был выделен вирус

гриппа H5N2 (G. Zhao et al., 2012). Утки и гуси, от которых был выделен вирус, были завезены в восточный Китай из провинций Шаньдун и Цзянсу. Анализ выделенных штаммов показал, что ген HA имеет высокую степень идентичности с геном HA штамма A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1), тогда как ген NA имел происхождение от штамма A/duck/Eastern China/142/2006 (H3N2) (G. Zhao et al., 2012; P. Jiao et al., 2012).

В этом же году в провинции Шаньдун, а также еще в шести провинциях Китая, включая Тибет, были зарегистрированы вспышки, вызванные вирусом гриппа H5N2 (C.F. Chang et al., 2016; G. Zhao et al., 2012)]. Впоследствии, о случаях выделения H5N2 также сообщалось на Тайване. В декабре 2014 года правительство Тайваня сообщило о нескольких вспышках HPAI H5N2. К январю 2015 года H5N2 широко распространился в нескольких провинциях Тайваня, где были зарегистрированы множественные случаи гибели домашней и дикой птицы (M.S. Dhingra et al., 2016; M.S. Lee et al., 2016). После уничтожения более 2 миллионов голов птицы с более чем 950 птицефабрик Тайваня, было объявлено, что данное событие является «самой крупной эпидемией» птичьего гриппа в истории страны (C.F. Chang et al., 2016).

Вирусы гриппа H5N2 были также задокументированы в Северной Америке. В ноябре 2014 года в Канаде была зарегистрирована вспышка, в результате которой погибло 11 000 голов индейки. Секвенирование подтвердило, что возбудителем этой вспышки был вирус гриппа H5N2 (J. Pasick et al., 2015). В результате исследования было показано, что в 2014 году вирусы гриппа H5Nx были занесены с дикими птицами на североамериканский континент (N.J. Hill et al., 2017; T. Saito et al., 2015; R. Bodewes, T. Kuiken, 2018; L. Ma et al., 2018; E. DeJesus et al., 2016; I. Donatelli et al., 2001; H. Wu et al., 2014; B.S. Kaplan et al., 2017). Реассортация HPAI H5N8 с вирусами LPAI привела к появлению H5N1 и H5N2 (FAO, 2019). Появившийся в ходе реассортации HPAI H5N2 содержал пять сегментов генома от вируса H5N8 и три сегмента от LPAIV североамериканской линии (N.J. Hill et al., 2017; T. Saito et al., 2015; R. Bodewes, T. Kuiken, 2018).

Впоследствии вирус гриппа H5N2 стал причиной нескольких вспышек среди диких и домашних птиц, в результате чего погибло или было уничтожено приблизительно 50 миллионов птиц (J.K. Taubenberger, D.M. Morens, 2017).

#### **1.10.4 Распространение вируса гриппа подтипа H7N9**

Пока внимание всего мира было сосредоточено на высокопатогенном вирусе гриппа птиц H5N1 и новом пандемическом вирусе H1N1pdm09 у людей, передача LPAI вирусов диких птиц домашним уткам, их реассортация с циркулирующими вариантами и последующее распространение в популяциях домашних птиц привела к появлению вирусов гриппа подтипов H7N9 и H7N7 (Т.Т-У. Lam et al., 2013; D. Liu et al., 2013). Гены внутренних белков этих вирусов имели происхождение от различных линий вирусов H9N2, циркулирующих среди домашней птицы (У. Guan et al., 2000; У.К. Choi et al., 2010; Н. Shi et al., 2010), некоторые из которых, в свою очередь, имели гены внутренних белков вирусов HPAI H5N1 (Т.Т-У. Lam et al., 2013; У. Guan et al., 2000; У.К. Choi et al., 2010). Вирусы H7N9 также оказались зоонозными, поскольку в феврале 2013 года в Шанхае и провинции Аньхой в Китае были зарегистрированы первые случаи заболевания людей (R. Gao et al., 2013; У. Chen et al., 2013). С февраля 2013 года по настоящее время было подтверждено 1568 случаев заболевания людей и 615 случаев смерти, в основном в Китае (FAO, 2018(a); A.J. Millman et al., 2015).

В период с февраля 2013 года по июль 2017 года было выделено пять сезонных волн заражения человека вирусами H7N9 (S. Su et al., 2017), причем волны 2–5 начинались примерно в октябре и продолжались до июня следующего года. В течение первых четырех волн, вирусы H7N9, которые выявлялись в ходе мониторинга на рынках живой птицы, относились к LPAI и характеризовались бессимптомным носительством или вызывали легкую степень заболевания у кур (M.J. Pantin-Jackwood et al., 2014; P. Jiao et al., 2018). В то же время, эти вирусы вызывали тяжелые респираторные заболевания у людей, которые иногда заканчивались смертью (R. Gao et al., 2013; У. Chen et

al., 2013). При этом в НА вирусов гриппа H7N9 были выявлены мутации (например, Q226L), которые ответственны за усиление связывания вируса с человеческими рецепторами, а также способностью к передаче воздушно-капельным путем между млекопитающими (D. Liu et al., 2013; S. Herfst et al., 2012; M. Imai et al., 2012). Хотя последнее и было подтверждено в экспериментах на хорьках (H. Zhu et al., 2013), передача вируса от человека к человеку так и не была достоверно доказана (A.J. Kucharski et al., 2015), и большинство случаев инфицирования людей все-таки было связано с непосредственным контактом с зараженной птицей на рынках (H. Yu et al., 2014).

Для борьбы с этим заболеванием рынки живой птицы в регионах, где регистрировался вирус H7N9, были закрыты (H. Yu et al., 2014), а общее число случаев заболевания людей в каждой из последующих волн уменьшалось (FAO, 2018(a)). Тем не менее, вирус, благодаря бессимптомному носительству или легкому течению заболевания у птиц, продолжал циркулировать и распространяться в Китае, чему способствовали торговля и перемещение сельскохозяйственной птицы. При этом, генетический дрейф привел к тому, что он начал разделяться на клады (T.T-Y. Lam et al., 2015).

Во время пятой волны, которая началась в сентябре 2016 года, несмотря на принятые противоэпидемические меры, наблюдалось быстрое увеличение числа случаев заболевания людей и более широкое географическое распространение вируса из юго-восточного Китая (J. Artois et al., 2018). При этом, во время пятой волны, в декабре 2016 и январе 2017 года было зарегистрировано появление новых вариантов вируса H7N9, которые были выделены от человека и домашней птицы (FAO, 2018(a); L. Zhou et al., 2017; J. Shi et al., 2017). Филогеографические исследования показали, что полиосновной сайт расщепления гемагглютиниона, вероятно, был внедрен в мае 2016 года в линию LPAI вирусов H7N9, циркулировавших в районе дельты реки Янцзы (L. Yang et al., 2017). Поскольку LPAI вирусы H7N9 были способны вызывать тяжелые заболевания и смерть у людей, неудивительно,

что HPAI варианты также были способны на это, но заболевание при этом прогрессировало быстрее, чем инфекция LPAI (L. Zhou et al., 2017). Также следует отметить наличие в PB2 вирусов H7N9, выделенных от людей, мутаций E627K или D701N, которые, как и в случае с HPAI H5N1, связаны с повышенной вирулентностью и адаптацией к млекопитающим (L. Zhou et al., 2017; R. Zhang et al., 2016).

В сентябре 2017 года Министерством сельского хозяйства Китая была начата общенациональная программа вакцинации домашней птицы в Китае. Для этого были использованы рекомбинантные двухвалентные инактивированные вакцины, включающие варианты H5 и H7 (Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, 2017). Общий уровень популяционного иммунитета в поголовье домашней птицы после вакцинации превышал 80% (при том, что целевое значение составляло 70%), хотя между разными провинциями имелись некоторые различия. Всего несколько (11 из более чем 80 000) образцов от птиц или окружающей среды дали положительный результат на вирус H7N9. При этом, с сентября 2017 по июнь 2018 года было зарегистрировано только три случая заболевания человека вирусом H7N9 по сравнению с более чем 700 в предыдущем сезоне. В этот период времени ожидалась шестая волна заболеваемости людей, но вакцинация домашней птицы ее предотвратила.

Риск распространения вирусов гриппа H7N9 в соседние с Китаем страны по-прежнему считается умеренным в случае торговли живой птицей, но низким для продуктов из домашней птицы и незначительным при распространении вируса дикими птицами (FAO, 2018(b)). Риск заражения людей на рынках живой птицы также находится на уровне от умеренного до низкого (FAO, 2018(b)). Небольшое количество положительных образцов от домашней птицы, выявленных зимой 2017-2018 гг. и почти полное отсутствие шестого сезонного всплеска инфекции H7N9 позволяют предположить, что политика массовой вакцинации домашней птицы была успешной в снижении

распространенности и риска заражения человека вирусами гриппа подтипа H7N9.

### **1.11 Стратегии борьбы с вирусами гриппа птиц**

Не существует единой стратегии контроля или профилактики птичьего гриппа, которая бы подходила для каждой страны, вируса и вида птиц (FAO, 2011; D.E. Swayne et al., 2013). Стратегии, которые были разработаны и использованы, зависели от целого ряда факторов, которые включали выявленные случаи циркуляции ВГА в стране, патогенность вируса, подтип гемагглютинина ВГА (например, H5 или H7), информацию о видах птиц, находящихся в группе риска или уже инфицированных, тип экосистемы (природные заповедники или сельскохозяйственные системы), наличие ветеринарной инфраструктуры и др. Со временем стратегии были изменены, основываясь на опыте предыдущих вспышек (FAO, 2011).

В большинстве развитых стран за последние 125 лет НРАИ попадал под действие различных программ искоренения, в которых использовались концепции, разработанные в начале восемнадцатого века, для борьбы с такими экзотическими болезнями домашнего скота, как чума крупного рогатого скота. Однако за последние 20 лет, связанных с распространением НРАИ вируса подтипа H5 A/goose/Guangdong/1/1996 в ряде развивающихся стран, их правительства и сельхозпроизводители так и не смогли добиться уничтожения вируса с помощью традиционных методов. Тем не менее, для контроля НРАИ были использованы некоторые комплексы мер, направленные на борьбу с вирусом. Вводились изменения в методах ведения сельского хозяйства и торговли сельхозпродукции, а также принимались меры, которые снижали риск распространения вируса. Было показано, что полное уничтожение инфицированного поголовья не является единственным доступным методом контроля ВГА, но в случае небольших вспышек оно все же остается предпочтительным. Так или иначе, этот метод считается основным и применяется в большинстве национальных планов действий в чрезвычайных

ситуациях (D.E. Swayne et al., 2011). При этом, существуют ситуации, когда общая стоимость альтернативных подходов ниже, и в некоторых местах как альтернативный или дополняющий подход к уничтожению поголовья следует рассматривать вакцинацию.

Около 60 лет назад LPAI вирусы не считались серьезной проблемой для сельского хозяйства. Эта точка зрения изменилась в 1960-х годах, когда у индеек, фазанов, перепелов и куропаток стали наблюдаться клинические синдромы респираторных заболеваний и снижения яйценоскости (B.C. Easterday, B. Tumova, 1972). Заболевание, которое характеризовалось от умеренной до тяжелой степени, выявленное в 1990-х годах в Азии и на Ближнем Востоке, было связано с LPAI вирусом H9N2 и также привело к введению программ контроля и профилактики этого вируса (A.A. Shehata et al., 2015). Надо сказать, что во всем мире программы контроля LPAI были более разнообразными, чем программы контроля HPAI, и варьировались от бездействия до применения вакцин или ликвидации поголовья, но обычно в сочетании с усилением биобезопасности ферм (D.E. Swayne et al., 2005). Так, например, после появления зоонозного LPAI вируса H7N9 в Китае в 2013 году было усилено давление на ветеринарные органы, что обеспечило усиление контроля H7N9 и других потенциально зоонозных LPAI вирусов.

Учитывая широкое распространение LPAI вирусов среди диких птиц, основные усилия по контролю распространения LPAI среди домашней птицы должны быть направлены на недопущение проникновения вирусов от диких птиц в популяции домашних. В США, Канаде, странах Евросоюза, Австралии и других развитых странах в ходе программ активного и пассивного мониторинга ВГП среди домашней птицы в большинстве коммерческих ферм ВГП выявлен не был. Предположительно, такие показатели были достигнуты в результате применения соответствующих мер биобезопасности (J.L. Gonzales et al., 2013).

Тем не менее, проникновение ВГП в коммерческие хозяйства регулярно происходит. При этом, более высокому риску заражения ВГП подвержены фермы и частные подворья, где птицу выращивают на открытом воздухе или в помещениях, которые могут обеспечить контакт домашней птицы с дикой. Распространению ВГП также способствуют рынки живой птицы. После заражения LPAI вирус быстро передается от одной птицы к другой. Надо сказать, что передача вируса не была зафиксирована между дикими курообразными (gallinacea) птицами (M.L. Perdue et al., 2000; D.L. Suarez, C.S. Schultz, 2000).

Хорошим примером в борьбе с распространением LPAI вирусов являются США, где за конкретные меры по контролю ВГП отвечают правительства штатов и частный сектор, за исключением LPAI H5 и H7, контроль за которыми осуществляется совместно с федеральными органами власти. Особо успешные государственные программы по контролю LPAI были разработаны в Миннесоте (D.A. Halvorson, 1987; P.E. Poss et al., 1897), Пенсильвании (M. Brugh, D.C. Johnson, 1987.) и регионе Дельмарва (Delmarva Poultry Industry, Inc., 2004) благодаря партнерству между птицеводческой промышленностью и правительствами штатов. За последние 30 лет эти программы неоднократно использовались для ликвидации различных LPAI (S. Davison et al., 2003; D.A. Halvorson, 1995; D.A. Halvorson, 1998; D.A. Senne, 2004; D.E. Swayne et al., 2005). План Миннесоты, разработанный в начале 1980-х годов, стал моделью для многих других государственных и национальных планов по контролю LPAI и включает ряд конкретных компонентов, таких как образовательные мероприятия, меры по ликвидации вируса, мониторинг и своевременная отчетность (P.E. Poss et al., 1897). С 2000 года в Италии также разработаны и внедрены успешные программы борьбы с LPAI H5 и H7, которые включают проведение экстренной или профилактической вакцинации инактивированными вакцинами против ВГА. При этом, применяемые вакцины содержат вирусы с подтипом нейраминидазы, отличающимся от дикого штамма. Среди вакцинированной

птицы также проводится серологический мониторинг ВГА. Помимо этого, применяются такие меры, как ликвидация зараженного поголовья, ограничение продажи сельскохозяйственной продукции и другие строгие карантинные меры (I. Capua, D.J. Alexander, 2004; I. Capua, D.J. Alexander, 2006; S. Marangon, I. Capua, 2006; S. Marangon et al., 2004). Однако несмотря на то, что эти программы имели успех в сдерживании угрозы распространения ВГП, многочисленные случаи проникновения вирусов LPAI и вирусов HPAI на птицефабрики показывают, что применяемые меры биобезопасности только снижают, но не исключают риски, особенно в регионах, которые располагаются на миграционных маршрутах перелетных птиц.

За последние два десятилетия некоторые LPAI вирусы подтипов H5 и H7 подверглись мутациям и приобрели свойства HPAI вирусов, тогда как другие циркулировали среди домашней птицы в качестве LPAI в течение многих лет (например, H7N9 в Китае с 2013 года). Прогнозирование того, какие LPAI вирусы будут или возможно преобразуются в HPAI, оказалось сложным даже при моделировании в лабораторных условиях (D.E. Swayne et al., 1998). В середине 1990-х годов Всемирная организация по охране здоровья животных (OIE) включила в критерии определения высокопатогенного вируса гриппа птиц наличие полиосновного сайта протеолитического расщепления в гемагглютинине H5 или H7 независимо от летальности *in vivo* для кур (OIE, 2014; USAHA, 1994). Однако, поскольку некоторые LPAI вирусы подтипов H5 и H7, которые не имели этого сайта, смогли мутировать в HPAI, национальные и международные принципы по борьбе с ВГП пришлось обновить. В результате в настоящее время в отношении всех LPAI вирусов подтипа H5 и H7 применяются те же требования, что и к вирусам HPAI (OIE, 2014). Единственной проблемой этих изменений является то, что на некоторые страны, в которых регистрируются только единичные вспышки, вызванные LPAI вирусами H5 или H7, накладываются соответствующие торговые ограничения.

## 1.12 Исследования вируса гриппа птиц в России

На территории Российской Федерации в разные годы и в разной степени эффективности осуществлялся мониторинг ВГП. Здесь надо особо отметить масштабные работы Института Вирусологии им. Д.И. Ивановского в рамках мониторинга ВГП, начало которых датируется еще 1970-ми годами прошлого века. В то время в бывшем СССР проводился мониторинг циркуляции вирусов гриппа в ключевых точках распространения вируса гриппа на территории современной России и сопредельных стран. За многие годы исследований от диких птиц было изолировано более 900 штаммов ВГП практически всех вариантов гемагглютинина и нейраминидазы. Число положительных находок колебалось от года к году и зависело от места сбора полевых материалов, достигая в среднем 3,5–5,7%, в отдельные годы — 8,9–12,7%, а среди уток — до 30% (Д.К. Львов с соавт., 2004). При этом, уже тогда были показаны широкие экологические связи вирусов гриппа А с птицами в разных экосистемах. В исследованиях Института Вирусологии им. Д.И. Ивановского вирусы гриппа были изолированы от более 100 видов птиц (в том числе от 30 видов уток), принадлежащих 12 отрядам, 25 семействам и более 50 родам (D.K. Lvov et al., 1987; D.K. Lvov et al., 2008; D.E. Stallkhecht, J.D. Brown, 2008).

С 2002 года мониторинг ВГП на территории России осуществлялся ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. С 2002 по 2012 год сбор биологического материала от диких и домашних птиц, а также морских млекопитающих осуществлялся на территории Западной Сибири, регионах Центральной Азии, а также на Дальнем Востоке России – ключевых точках распространения ВГП, лежащих на основных миграционных маршрутах диких птиц. За исследованный период на указанных территориях было собрано более 25000 образцов биоматериала, которые были исследованы на наличие ВГА. Исследования показали, что в различные годы процент вирусносительства среди диких птиц различался в зависимости от региона и времени сбора материала, но большинство вирусов было выделено от птиц,

принадлежащих к отрядам гусеобразные и ржанкообразные (М.А. De Marco et al., 2016; К.А. Шаршов с соавт., 2014). Так, с 2007 по 2012 год на территории Дальнего Востока России было собрано и проанализировано 6091 образец от 171 различных видов диких птиц, от которых было выделено 40 штаммов вируса гриппа, относящихся к подтипам ВГА Н3, Н4, Н6, Н10, Н11 и Н1, Н2, Н6 и Н8 в различных комбинациях. Процент выделения вируса на территории Дальнего Востока составил 0,65%, тогда как в результате мониторинга ВГП на территории Западной Сибири он был значительно выше. В различные годы выделение вируса на данной территории варьировалось от 3,5% до 12,5% (С.Г. Сайфутдинова с соавт., 2012; С.Г. Сайфутдинова с соавт., 2010 (a,b); М.В. Сивай с соавт., 2010; М. Sivay et al., 2012; М. Sivay et al., 2016).

В рамках контроля над распространением ВГП на территории России стоит отметить деятельность Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), которое осуществляет мониторинговые исследования в ключевых точках распространения ВГП и участвует в ликвидации последствий вспышек высокопатогенного гриппа птиц на территории Российской Федерации. Одними из ключевых работ специалистов ФГБУ «ВНИИЗЖ» являются изучение с 2009 года циркуляции вируса гриппа птиц на территории убсунурского миграционного очага республики Тыва (М.С. Волков с соавт., 2016), а также проведение эпизоотологического мониторинга гриппа птиц на территории республики Крым (Д. В. Гадзевич с соавт., 2019). Помимо этого, в 2016-2017 гг. под руководством ФГБУ «ВНИИЗЖ» были применены жесткие карантинные мероприятия и радикальные меры при ликвидации высокопатогенного гриппа в популяции домашних птиц, что позволило остановить волну эпизоотий и предотвратить дальнейшее распространение вируса на территории России (М.С. Волков с соавт., 2018).

Помимо вышеуказанных многолетних мониторинговых исследований, в отдельных регионах России отдельными научными группами также осуществлялся сбор и анализ биоматериала на наличие вируса гриппа птиц.

Так, на территории Восточной Сибири с 2005 по 2012 гг. было собрано и исследовано 3384 образца биоматериала от 901 дикой птицы. В результате исследований была выявлена циркуляция 17 различных подтипов ВГП (П.А. Савченко с соавт., 2015; А.П. Савченко с соавт., 2014; А.П. Савченко с соавт., 2015; Г.А. Данчинова с соавт., 2015).

### **1.13 Заключение по обзору литературы**

За многие годы изучения вируса гриппа птиц, в том числе на территории Российской Федерации, накоплен огромный объем информации о его биологических характеристиках и методах диагностики, об особенностях циркуляции в природе и специфичности некоторых его вариантов в отношении различных видов хозяев. Тем не менее, благодаря относительно быстрой эволюции и экологическим особенностям его распространения, вирус гриппа птиц регулярно преподносит сюрпризы в виде вспышек среди сельскохозяйственной птицы в новых географических регионах или появления нового антигенного варианта, способного преодолевать межвидовой барьер. Так или иначе, большинство исследователей сходится во мнении, что одной из основных мер по контролю над распространением возбудителя является мониторинг вируса гриппа птиц.

К сожалению, масштабные работы по мониторингу ВГП Института Вирусологии им. Д.И. Ивановского были в итоге завершены. Мониторинг, который осуществлялся в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора до 2013 года, являлся недостаточно совершенным. С одной стороны, сбор биологического материала осуществлялся в ключевых точках, которые располагаются на путях основных миграционных маршрутов диких птиц, что позволяло своевременно выявлять случаи заноса вируса гриппа на территорию Российской Федерации. С другой стороны, дальнейшие пути распространения ВГП, зачастую оставались на уровне гипотез и были не всегда ясны. При этом, мониторинг ВГП среди домашней птицы осуществлялся спорадически и недостаточно масштабно, чтобы оценить риски и выявить случаи

проникновения различных вариантов ВГП в популяции домашних птиц. В связи с этим, встал вопрос о создании на территории России новой комплексной системы мониторинга ВГП, которая должна была учитывать опыт предыдущих десятилетий борьбы с вирусом гриппа в стране, но также необходимо было усиливать данную деятельность как расширением географии проведения мониторинга, так и увеличением числа объектов исследования, в том числе осуществлять мониторинг ВГП среди людей.

В 2013 году Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека было принято решение о создании в Российской Федерации новой комплексной системы мониторинга за вирусами гриппа птиц. Такая система должна была включать выявление циркулирующих среди диких и домашних птиц и других животных вариантов ВГА и углубленное изучение основных биологических свойств, определяющих пандемический потенциал выделенных штаммов. Помимо этого, важным элементом данной системы должна была стать оценка популяционного иммунитета людей, по роду своей деятельности имеющих контакт с дикой или домашней птицей, к различным вариантам высокопатогенного вируса гриппа. Полученные в ходе такой работы данные позволят определить ключевые факторы, влияющие на пандемический потенциал циркулирующих вариантов вируса гриппа, а также оценить степень угрозы распространения этих вариантов среди людей.

Данная диссертационная работа посвящена многолетним исследованиям в рамках комплексного мониторинга вируса гриппа на территории Российской Федерации, по результатам которых дана оценка эффективности существующей системы. Также, в рамках данной работы изучены основные биологические свойства наиболее важных в эпидемиологическом и эпизоотологическом значении вирусов гриппа птиц.

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Система мониторинга гриппа птиц**

С 2013 по 2016 г. описываемая в данной работе система мониторинга регламентировалась приказом Руководителя Роспотребнадзора от 30.09.2013 г. № 714 «Об организации мониторинга за циркуляцией вирусов гриппа птиц». В рамках данного приказа мониторинг осуществлялся ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и 37 региональными учреждениями Роспотребнадзора – Центрами гигиены и эпидемиологии (ЦГиЭ). Региональные учреждения Роспотребнадзора организовывали взаимодействие с местными лечебными учреждениями и ветеринарной службой, которые собирали первичный материал от людей и животных и направляли его в региональный ЦГиЭ. Из ЦГиЭ биоматериал направляли в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора для диагностики, изоляции вируса гриппа, углубленного изучения и оценки его пандемического потенциала.

Впоследствии, в целях совершенствования мониторинга вируса гриппа птиц, данная система была модернизирована созданием трех опорных баз при Управлениях Роспотребнадзора по Хабаровскому краю, Новосибирской области и Краснодарскому краю (рис. 8). В рамках дополнительного приказа Руководителя Роспотребнадзора №842 от 04.08.2016 «Об организации опорных баз по мониторингу за вирусом гриппа с пандемическим потенциалом» первичная диагностика биоматериала от животных и людей осуществлялась в региональном ЦГиЭ. В случае выявления положительных образцов, их направляли в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. В настоящее время система мониторинга за вирусом гриппа птиц охватывает 48 регионов Российской Федерации.



Рисунок 8. Система мониторинга вируса гриппа птиц на территории России. Красным цветом обозначены регионы, закрепленные за опорной базой при Управлении Роспотребнадзора по Краснодарскому краю. Зеленым цветом обозначены регионы, закрепленные за опорной базой при Управлении Роспотребнадзора по Новосибирской области. Синим цветом обозначены регионы, закрепленные за опорной базой при Управлении Роспотребнадзора по Хабаровскому краю. Оранжевым цветом обозначены регионы, осуществляющие деятельность в рамках приказа Руководителя Роспотребнадзора от 30.09.2013г. № 714 и направляющие биоматериал непосредственно в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Принципиальная схема мониторинга вируса гриппа, а также работы по изучению некоторых биологических свойств выделенных изолятов и формированию коллекции штаммов вируса гриппа А проводилась по схеме, представленной на рисунке 9.

Лабораторные исследования были проведены в соответствии с методами, рекомендованными Всемирной Организацией Здравоохранения (WHO, 2002) и Международным эпизоотическим бюро (OIE, 2009). Все оборудование, использованное в работе, прошло метрологическую проверку в соответствии с действующими правилами и нормативными документами.

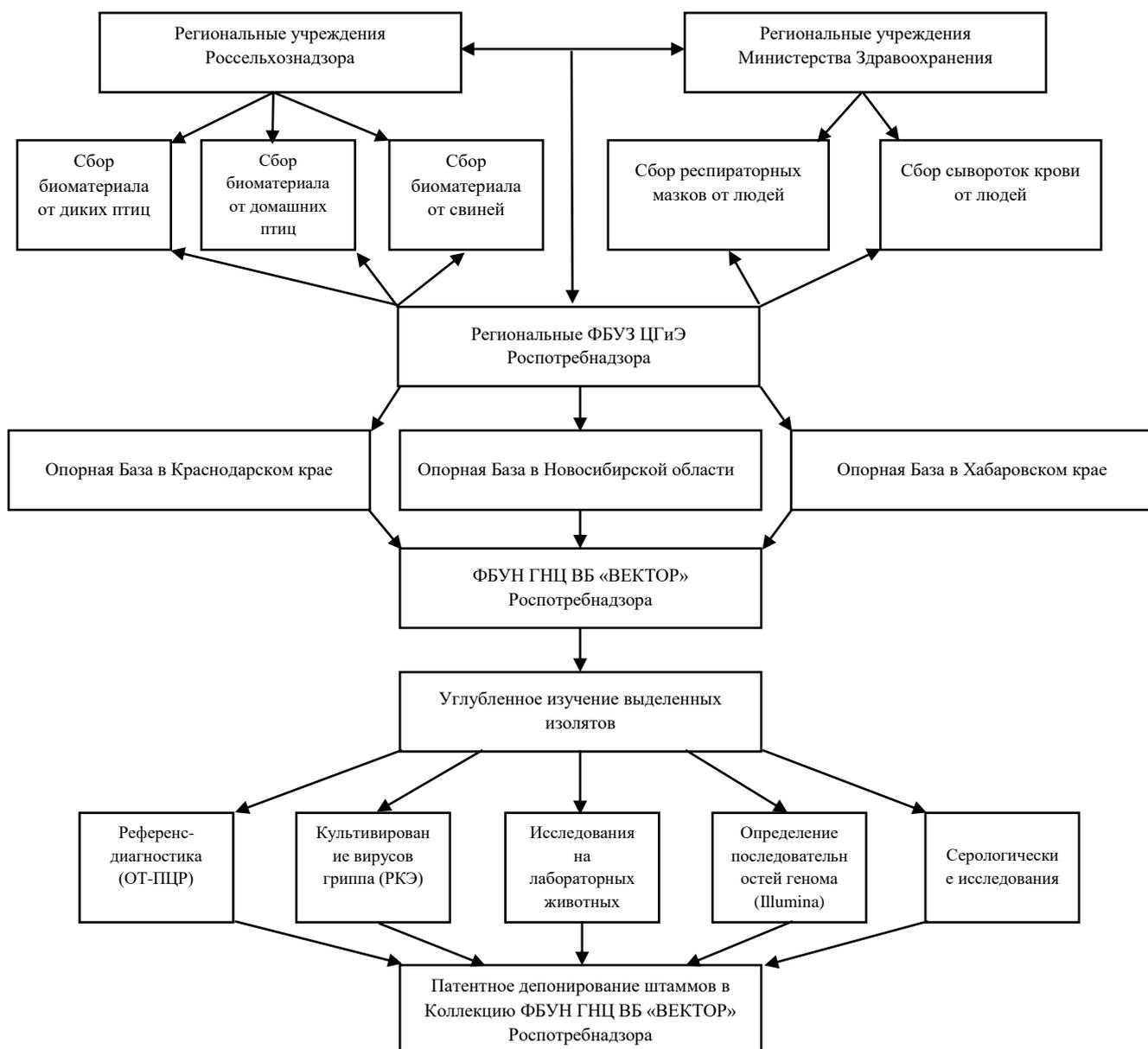


Рисунок 9. Схема проведения исследований в рамках мониторинга вируса гриппа птиц на территории России

## 2.2 Транспортировка и хранение биоматериала

Транспортировка биоматериала из регионального ЦГиЭ или Опорной Базы в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора осуществлялась лицензированными транспортными компаниями. Передачу биоматериала и его упаковку осуществляли в строгом соответствии с Санитарными Правилами «СП 1.2.036-95 Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности»

В случае анализа пробы в региональной лаборатории, если анализ пробы производился в течение 48 часов после сбора, то пробирку с биоматериалом помещали в охлажденный термоконтейнер и транспортировали в лабораторию для проведения анализа. Хранение биоматериала осуществляли при +4°C. Если до проведения анализа требовалось больше времени, то пробирки с биоматериалом до анализа хранили в жидком азоте или в низкотемпературной морозильной камере при температуре не выше -70°C, а транспортировку образца осуществляли в термоконтейнере, содержащем сухой лед. При транспортировке на сухом льду использовали дополнительную упаковку материала, чтобы исключить контакт биоматериала с углекислым газом, который способен инактивировать вирус гриппа.

### **2.3 Сбор биоматериала от птиц**

Сбор биологического материала от домашней птицы осуществляли на птицефабриках и частных подворьях. Сбор биологического материала от диких птиц проводили на территориях вокруг крупных озер в местах наибольшего скопления дикой птицы. Птицы добывались отстрелом, а также при помощи орнитологических паутильных сетей (мелкие воробьинообразные и кулики). Соответствующие разрешения на добычу объектов животного мира были получены в Территориальных Управлениях Россельхознадзора. Виды птиц, от которых брали материал, были определены профессиональными орнитологами и зоологами региональных ЦГиЭ. Биоматериал от птиц был представлен мазками из клоаки или трахеи, а также фрагментами внутренних органов. Помимо этого, осуществлялся сбор проб помета.

Трахеальные мазки брали из дыхательного прохода (трахеи) в задней части ротовой полости птицы. Чтобы добиться его раскрытия необходимо слегка вытянуть язык птицы вперед, что сделает трахею в задней части языка более доступной. После того, как птица сделает вздох, хрящ, защищающий трахею, открывается. После этого в нее вводили наконечник аппликатора, затем осторожным движением по стенкам и задней части трахеи брали мазок.

Клоакальные мазки брали путем введения всего наконечника аппликатора внутрь клоаки и поворачивания его там двумя или четырьмя круговыми движениями. Прежде чем поместить мазок в криопробирку, с наконечника аппликатора аккуратно стряхивали крупные частицы помета. Взятый мазок помещался в транспортную среду в промаркированные криопробирки (мазок от каждой особи помещался в отдельную пробирку). После этого стержень отрезали или отламывали таким образом, чтобы конец аппликатора остался в транспортной среде, а криопробирка могла быть герметично укупорена.

Фрагменты внутренних органов отбирали в случае выявления падежа или от отстрелянных диких птиц. Внутренние органы (фрагменты трахеи, легких, селезенки, печени, мозга, кишечника) получали при вскрытии птиц. При заборе проб органов использовали стерильный хирургический инструмент (ножницы, скальпели, пинцеты) и стерильную посуду. Перед вскрытием тушку птицы погружали в дезинфицирующий раствор (5% раствор хлорамина Б) на 20-30 секунд. При взятии проб органов место будущего разреза обрабатывали 5% раствором йода или 70% раствором этилового спирта, после чего стерильными инструментами разрезали кожу, мышцы брюшной стенки или кости черепа. С помощью второго набора инструментов отделяли фрагменты внутренних органов необходимого размера и помещали в стерильные одноразовые пластиковые пробирки.

Образцы фекалий птиц собирали стерильным шпателем или стерильной ватной палочкой в пробирку. Объем образца составлял приблизительно 1 мл. Пробы собирали как в случае регистрации отдельных особей птиц, так и при взлете моновидовой стаи, при этом всегда фиксировался вид птицы. Обязательно отбирался единичный (отдельный) образец свежих, невысохших, недолго лежащих фекалий.

Пробирки с мазками до анализа хранили в низкотемпературной морозильной камере при температуре не выше  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Для транспортировки мазков использовали доступные коммерческие транспортные среды (например, производства Soran, Италия) или транспортные среды, приготовленные самостоятельно непосредственно в региональной лаборатории согласно рекомендованной методике (WHO, 2011).

Все манипуляции со средой проводили в стерильных условиях. Пробирки со средой хранили при +4 °С или при комнатной температуре не более двух суток; при необходимости более длительного хранения – при температуре -20 °С.

#### **2.4 Сбор биоматериала от свиней**

Сбор биологического материала от свиней (мазки из носа) осуществляли на свинофермах и частных подворьях. Для взятия мазка из носа животное фиксировали таким образом, чтобы обеспечить безопасный отбор проб. Животное весом менее 20 килограммов фиксировали руками. Для фиксации более крупных животных использовали специальные станки или веревки.

Зонд вводили в ноздрю животного на 5-7 см. Мазок брали последовательно с задних стенок обеих ноздрей возвратно-поступательными вращающими движениями (мазок от каждой особи помещали в отдельную пробирку). После взятия мазка зонд помещали в пробирку, после этого стержень отрезали или отламывали таким образом, чтобы кончик аппликатора остался в транспортной среде, а микропробирка могла быть герметично укупорена. Пробирку закрывали и маркировали, после чего делали соответствующую запись в учетную форму.

Для транспортировки мазков использовали доступные коммерческие транспортные среды (например, производства Soran, Италия) или транспортные среды, приготовленные самостоятельно непосредственно в региональной лаборатории согласно рекомендованной методике (WHO, 2011).

#### **2.5 Сбор биологического материала от людей**

Биоматериал от людей был представлен мазками из ротоглотки и носа, а также парными образцами сывороток крови. Взятие образцов у людей

проводил медицинский персонал лечебно-профилактических учреждений. Биоматериал отбирали от людей, по роду своей деятельности имеющих тесный контакт с дикой или домашней птицей (охотники, сотрудники птицефабрик, фермеры), а также людей, проживающих (пребывающих) вблизи мест массового скопления перелетной и домашней птицы. Пробы брали в случае регистрации у людей симптомов ОРВИ в межэпидемический сезон, а также при контакте людей с павшей или больной птицей, у которой было выявлено инфицирование вирусом гриппа птиц.

Забор мазков из ротоглотки и носа от людей с проявлениями симптомов ОРВИ осуществляли в первые трое суток от начала заболевания стерильными зондами. При взятии материала из носа тампон вводился последовательно в обе ноздри в область нижнего носового хода. После этого мазок помещали в пробирку с транспортной средой. В качестве транспортной среды использовали доступные коммерческие транспортные среды (например, Соран, Италия) или приготовленные непосредственно в лаборатории, для чего использовали среду для культур клеток Игла MEM с 0,5% бычьего сывороточного альбумина V фракция, 50 мкг/мл гентамицина и 2,5 мкг/мл амфотерицина В. Мазки из ротоглотки собирали аналогичным образом, плотно прижимая зонды к участкам миндалин и задней стенки глотки.

Парные образцы сывороток крови отбирали от людей с проявлениями симптомов ОРВИ, а также от людей без проявления симптомов, но контактировавших с павшей или больной птицей. Сбор первого образца осуществляли в первые трое суток от начала заболевания или контакта с птицей. Второй образец от человека брали через 21 день после взятия первого для выявления случаев сероконверсии.

Забор крови осуществляли из периферической (локтевой) вены в объеме 3-5 мл одноразовыми шприцами или одноразовыми системами вакуумного отбора проб крови (например, Vacutainer), не содержащих антикоагулянт. Венозную кровь отстаивали в пробирке при комнатной температуре в течение 30 мин до полной ретракции сгустка, затем пробирки помещали в холодильник

на ночь. На следующий день сыворотку отделяли от сгустка автоматической пипеткой в чистые пробирки и осветляли центрифугированием при 2000 – 3000 об/мин в течение 10 мин. Осветленную сыворотку отбирали пипеткой в чистую промаркированную пробирку. Хранение образцов сывороток крови осуществляли при температуре не выше -20 °С.

## **2.6 Культивирование вирусов гриппа на развивающихся куриных эмбрионах**

Для выделения изолятов вируса гриппа А проводили три последовательных пассажа на 9-10-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) (ЗАО Птицефабрика «Ново-Барышевская», р.п. Кольцово Россия), согласно рекомендованной методике (WHO, 2011).

Пробирку с мазком или фрагментом органа размораживали. Фрагмент органа затем гомогенизировали путем растирания в стерильных фарфоровых ступках с фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим антибиотики, или с использованием автоматического гомогенизатора (Tissue-Lizer, Qiagen). Полученные гомогенаты и мазки центрифугировали в течение 5 мин при 8000 об/мин.

Супернатант в объеме 0,1 мл, содержащий биологический материал, инокулировали в аллантоисную полость РКЭ. Каждый образец биологического материала инокулировали в 3 РКЭ. После заражения эмбрионы инкубировали во влажной атмосфере (60%) при 37°С и осматривали ежедневно для выявления погибших РКЭ. У последних пробы аллантоисной жидкости (а.ж.) отбирали в день гибели РКЭ. По истечении трех суток инкубирования а.ж. отбирали у всех РКЭ, объединяя жидкости, собранные у эмбрионов, зараженных одним и тем же образцом биологического материала.

Собранную а.ж. тестировали в реакции гемагглютинации (РГА). Образцы а.ж. с выявленной гемагглютинирующей активностью использовали для дальнейшего их тестирования молекулярно-биологическими и серологическими методами на наличие вируса гриппа А. Те образцы а.ж., в которых не была выявлена гемагглютинирующая активность в первом

пассаже, использовали для проведения следующего пассажа. Количество пассажей выбиралось в соответствии с результатами РГА, но не более трех.

Второй и третий пассажи проводили аналогично первому. Перед введением в эмбрион а.ж. осветляли низкоскоростным центрифугированием в течение 5 мин при 3000 об/мин, затем в пробу добавлялись те же антибиотики, что и при приготовлении среды для транспортировки мазков. При отсутствии гемагглютинирующей активности у а.ж. после третьего пассажа делали вывод об отсутствии вируса гриппа птиц или другого вируса, вызывающего агглютинацию эритроцитов, в исходном образце соответствующего биологического материала.

Хранение вирусосодержащей аллантоисной жидкости, осуществляли при 4°C в течение времени, не превышающего 1 неделю. Для длительного хранения пулов вируса использовалось низкотемпературное хранилище (-70°C).

## **2.7 Определение инфекционного титра вируса**

Для каждого штамма получали пул вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Для этого готовили десятикратные разведения вирусосодержащего материала (1-10) на стерильном фосфатно-солевом буферном растворе. Для каждого разведения использовались 10 РКЭ. Вирусосодержащую аллантоисную жидкость одинакового разведения собирали в общий пул, который затем оценивали по продукции гемагглютинина в РГА и 50% инфекционному титру на РКЭ. Для хранения выбирали пулы с наибольшими показателями. Продукцию гемагглютинина оценивали в РГА.

Инфекционный титр вируса (ЭИД<sub>50</sub>/мл) вычисляли по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева (И.П. Ашмарин и А.А. Воробьев, 1962) по следующей формуле:

$$\lg \text{ЭИД}_{50} = \lg D_n + d(\sum L_i - 0.5)$$

Где  $D_n$  – доза, дающая максимальный эффект,

$L_i$  – отношение погибших при заражении данной дозой к общему числу зараженных данной дозой

i – номер дозы

d – логарифм кратности разведения

## **2.8 Проведение реакции гемагглютинации и реакции торможения гемагглютинации**

Подготовку суспензии эритроцитов и проведение реакции гемагглютинации (РГА) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА) осуществляли по общепринятой методике, рекомендованной ВОЗ (ВНО, 2011).

В работе использовали 10 mM фосфатно-солевой буферный раствор (pH=7.2) и 0,5% суспензию эритроцитов крови различных видов птиц и млекопитающих (гусь, петух, лошадь). Для проведения РГА и РТГА применяли серологические 96-луночные планшеты с U- или V-образными лунками. В 96-луночном микропланшете готовили последовательные двукратные разведения тестируемой а.ж. Конечный объем разведенной а.ж. в каждой лунке в РГА и РТГА составлял 50 мкл.

О наличии гемагглютинирующих агентов в образце а.ж. судили по равномерной седиментации осадка эритроцитов на дне лунки. В этом случае результат РГА считался положительным. Наибольшее разведение а.ж., где РГА была положительна, принимали за конечную точку титрования, что соответствовало 1 гемагглютинирующей единице (ГАЕ).

Для исследования антигенных свойств изолята, вируссодержащую а.ж. разводили таким образом, чтобы в 25 мкл содержалось 4 ГАЕ вируса. Для постановки РТГА использовали набор референс подтипспецифических сывороток и антигенов, полученных из Исследовательского детского госпиталя им. Св. Иуды (г. Мемфис, штат Теннесси, США). Перед использованием сыворотки в соответствии с рекомендациями ВОЗ обрабатывали RDE (Receptor destroying enzyme) с целью удаления неспецифических термостабильных ингибиторов. При проведении РТГА с вирусами гриппа свиней подтипа H3N2 (раздел 3.6.3), для исключения неспецифического взаимодействия вируса с эритроцитами, в суспензию

эритроцитов добавляли раствор озельтамивира до его концентрации в суспензии 20нМ.

Исследуемые сыворотки считали положительными, если обратный титр антител равен или больше 20.

## 2.9 Проведение реакции нейтрализации

Реакцию нейтрализации проводили с целью определения уровня антител в сыворотках крови по классической методике, основанной на предотвращении инфицирования монослоя клеток MDCK, определяемого по отсутствию цитопатического эффекта, согласно описанной процедуре (E. Spackman et al. 2014). Согласно методике, готовили двукратные разведения сывоток, к которым затем добавляли 100 TCID<sub>50</sub>/мл исследуемого вируса и инкубировали при 37 °С в течение часа. После чего смесь сыворотки и вируса вносили в лунки 96-луночных культуральных планшетов с подготовленным монослоем клеток и инкубировали в течение 48 часов при 37 °С. Подготовку монослоя клеток MDCK, а также заражение культуры клеток с целью определения TCID<sub>50</sub> осуществляли по методике, рекомендованной ВОЗ (WHO, 2011). Расчет TCID<sub>50</sub> осуществляли по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева (И.П. Ашмарин и А.А. Воробьев, 1962).

Сыворотки считали положительными, если обратный титр антител был равен или больше 20

## 2.10 Определение чувствительности вирусов гриппа к противовирусным препаратам

Определение чувствительности вирусов гриппа осуществляли с использованием планшетного флуориметра TECAN infinite F200 с использованием параметров, представленных в таблице 1.

Таблица 1. Параметры для измерения флуоресценции для TECAN infinite F200

	Длина волны	Ширина щели
Свет возбуждения	360 нм	2.5 нм
Флуоресценция (испускаемый свет)	448 нм	20 нм

Флуоресцентный метод основан на измерении интенсивности флуоресценции конечного продукта 4-метилумбеллиферона, освобожденного

из субстрата 2'-(4-метилумбеллиферил)-ADN-ацетилнейраминовой кислоты (Munana) благодаря ферментативной активности нейраминидазы вируса гриппа.

Для работы использовались следующие материалы:

1. 2-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) (Sigma, США),
2. 2-[N-morpholino]ethanesulphonic acid (MES) (free acid)(Sigma, США),
3. 10% хлорид кальция (CaCl<sub>2</sub>) в ампулах (Дальхимфарм, Россия),
4. 96% Этанол,
5. Surfactant-Amps-NP-40 (10% solution) (Thermo Scientific™, США),
6. NaOH натрия гидроокись (Медиген, Россия),
7. Zanamivir (Sigma-Aldrich, США),
8. Озельтамивира карбоксилат. OSELTAMIVIR CARBOXYLATE (Sequoia Research Products Ltd., США).
9. Панель контрольных вирусов с известными параметрами чувствительности к противовирусным препаратам (табл. 2),

Таблица 2. Вирусы гриппа, использованные в качестве контроля чувствительности к ингибиторам нейраминидазной активности.

Штаммы вируса гриппа	Каталожный номер IRR (International Reagent Resource)	Чувствительность к NA-ингибиторам	
		озельтамивир	занамивир
A/California/09/09 H1N1pdm09 - wt	FR-201	норма	норма
B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata)	FR-1364	норма	норма
A/North Carolina/39/2009 H1N1pdm09 H275Y	FR-488	Высоко резистентный	норма
A/Bethesda/956/2006 H3N2 R292K	FR-1443	Высоко резистентный	Резистентный

Процедура анализа активности нейраминидазы:

1. Подготовить необходимые реагенты:
  - А. 2X Буфер (13г MES; 8 мл 1М CaCl<sub>2</sub>; 992 мл дист. H<sub>2</sub>O),
  - Б. 1X Буфер (2X Буфер 1:1 с дист. H<sub>2</sub>O),
  - В. 300 мкМ раствор занамивира (5 мг в 50.13 мл 2X буфера),
  - Г. 300 мкМ раствор озельтамивира (5 мг в 50.13 мл 2X буфера),
  - Д. 2.5 мМ раствор MUNANA (20 мл дист. H<sub>2</sub>O, 25 мг MUNANA),

Е. Стоп-раствор (2.225 мл 0.824 М NaOH, 11.0 мл 96% этанола),

Ж. Тестируемые вирусы (100 мкл вирусосодержащей а.ж., 900 мкл 1X Буфера с 0,1% NP-40)

2. В лунку А1 U-образного планшета внести 50 мкл 2X буфера,
3. В лунки В1-Н1 внести по 50 мкл последовательных десятикратных разведений противовирусного препарата,
4. Во все лунки ряда 1 добавить по 50 мкл исследуемого вируса,
5. Повторить пункты 2,3 для остальных рядов планшета, в которых применяются контрольные вирусы,
6. Закрыть планшет и инкубировать при температуре 37 °С в течение 45 минут,
7. Добавить 50 мкл раствора MUNANA рабочей концентрации во все лунки планшета,
8. Инкубировать планшет в течение 1 часа при 37 °С.
9. Остановить реакцию добавлением 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
10. Поместить планшет в флуориметр и произвести расчет  $IC_{50}$ .

## **2.11 Исследования на лабораторных животных**

В работах по изучению вирулентности штаммов использовали мышей линии Balb/c, самок массой тела 16-18 г. В работах по получению референс-сывороток использовали хорьков возрастом от 6 месяцев. Животные были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Всех животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды.

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

ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол-заявка № ГНЦ ВБ «Вектор»/04-04.2018 от 03.12.2018).

Животных, полученных для проведения исследований, выдерживали на карантине 3 суток. В течение этого времени проводили осмотр на наличие у них признаков острых респираторных заболеваний (повышение температуры, выделения из носовой полости, конъюнктивиты и т.д.).

Содержание мышей осуществляли в садках-микроизоляторах группами не более 10 животных. Хорьков содержали в просторных клетках. Садки и клетки с животными размещали в шкафах для содержания животных, с отдельной вытяжной системой, оборудованных поилками и кормушками. В помещениях для содержания животных поддерживались следующие условия:

1. температура окружающего воздуха 18-26 °С;
2. световой режим естественного освещения;
3. относительная влажность 30-70 %;
4. 100 % вентилирование без рециркуляции со сменой воздуха 7-12 объемов комнаты в час.

### **2.11.1 Определение вирулентности штаммов вируса гриппа на мышах линии Balb/c**

Для определения 50% инфекционной дозы исследуемого штамма вируса гриппа мышей заражали интраназально десятикратными разведениями вирусосодержащей жидкости в объёме 50 мкл на одно животное. Для исследования ИД<sub>50</sub> одного штамма использовали 6 групп по 10 мышей. Перед заражением мышей подвергали наркотизации углекислым газом. Для разведения вирусосодержащей жидкости использовали фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением антибиотиков. Животным контрольной группы вводили стерильный фосфатно-солевой буферный раствор в том же объеме.

По истечении трех суток после заражения животных подвергали эвтаназии под воздействием углекислого газа. От каждой мыши отбирали все

доли легких. Далее легкие гомогенизировали с использованием автоматического гомогенизатора (Tissue Lizer, Qiagen, Германия). Полученный гомогенат собирали в микропробирки для дальнейшего заражения РКЭ. Каждый образец гомогената легких мышей инокулировали в отдельный РКЭ. После инкубации аллантоисную жидкость тестировали в РГА на наличие в образце вируса гриппа. Инфекционную дозу (ИД<sub>50</sub>) рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева (И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев, 1962).

Для определения 50% летальной дозы исследуемого штамма вируса гриппа мышей заражали интраназально десятикратными разведениями вирусосодержащей жидкости в объеме 50 мкл на одно животное. Для исследования ЛД<sub>50</sub> одного штамма использовали 5 групп по 6 мышей. Перед заражением мышей подвергали наркотизации углекислым газом. Для разведения вирусосодержащей жидкости использовали фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением антибиотиков. Животным контрольной группы вводили стерильный фосфатно-солевой буферный раствор в том же объеме.

Учет гибели контрольных и инфицированных животных в каждом разведении вели в течение 14 суток после заражения. Летальную дозу (ЛД<sub>50</sub>/мл) вычисляли по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева (И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев, 1962).

### **2.11.2 Получение поликлональных сывороток крови хорьков**

Принцип метода заключался в получении штамм специфичной референс-сыворотки от хорьков, перенесших инфекцию, вызванную определенным штаммом вируса гриппа. Референс-сыворотки в дальнейшем использовали для субтипирования и изучения антигенных свойств новых изолятов ВГА в реакции торможения гемагглютинации. Для получения сыворотки с наибольшим титром противовирусных антител ее получали от переболевших хорьков после их инфицирования живым вирусом. Заражение хорьков вирусами гриппа проводили интраназально дозой вируса 10<sup>6</sup> ЭИД<sub>50</sub>.

Перед инфицированием у каждого подопытного животного брали пробу сыворотки крови для определения в РТГА отсутствия антител к исследуемому штамму, а также сезонным вирусам гриппа человека подтипов А/Н1N1pdm09, А/Н3N2, В/Victoria, В/Yamagata. В эксперимент допускали только серонегативных животных с титром антител против контрольных вирусов в разведении не выше 1:20. При титре антител  $\geq 1:20$  животное не использовали для получения штамм специфичной референс-сыворотки.

Перед взятием крови животное наркотизировали в атмосфере CO<sub>2</sub>, после чего помещали наркотизированного хорька на рабочую поверхность в положении лежа на спине. Инъекционной иглой с присоединенным шприцем пунктировали полость сердца и медленно отбирали 1 – 1,5 мл крови. Затем кровь сливалась в пробирку. Полученный от хорька образец крови оставляли на один час при комнатной температуре для ускорения свертывания, после чего отделяли образовавшийся сгусток от стенок пробирки и оставляли пробирку на ночь при температуре 4-8 С°. Далее пробирку центрифугировали при 1,5 тыс. об/мин в течение 10 мин, после чего сыворотку переносили в чистую пробирку.

Перед заражением животное наркотизировали в атмосфере CO<sub>2</sub>. Наркотизированного хорька помещали на рабочей поверхности БМБ 2 класса в положении лежа на спине с приподнятой головой. Дозатором вводили вирусодержащий материал интраназально в объеме 500 мкл (по 250 мкл в каждый носовой ход). Животное помещали в шкаф для содержания животных. После этого за животными осуществляли ежедневное наблюдение в течение 21 суток и оценивали активность, аппетит, употребление животным воды.

Пробы крови с целью предварительного определения уровня антител у хорьков брали на 14 сутки после инфицирования путем пункции сердца. Пробу сыворотки крови брали для определения сроков заключительного сбора крови или реинфицирования. Если через 14 суток после заражения в сыворотке хорька отсутствовали антитела к штамму вируса гриппа, которым был инфицировано животное, проводили повторное инфицирование хорька. Если

титр антител был ниже либо равен 1:64 хорька повторно инфицировали на 21 сутки после первого инфицирования. При этом использовали инфицирующую дозу выше в 10 – 100 раз, чем при первичном заражении.

## 2.12 Постановка полимеразной цепной реакции

### 2.12.1 Выделение РНК

Выделение РНК осуществляли с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

### 2.12.2 Реакция обратной транскрипции

Синтез кДНК осуществляли с использованием комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

### 2.12.3 ПЦР-амплификация в режиме реального времени и детекция продуктов амплификации

Детекцию генетического материала вируса гриппа осуществляли на амплификаторе Rotor-Gene Q при соответствующей программе амплификации и детекции флуоресцентного сигнала с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Influenza virus А-тип-Н5, Н7, Н9-FL», набора реагентов «АмплиСенс® Influenza virus А Н5Н1 – FL» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя, а также с использованием набора реагентов, разработанных в отделе зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, включающего подтип-специфические праймеры (табл. 3, 4).

Таблица 3 - Подтипспецифичные праймеры на НА ген (K.Tsukamoto et al., 2008)		
Подтип НА	Место гибридизации праймера(5')	Последовательность праймера
Н1	прямой Н1-550 обратный Н1-1016	5'-AACAA YAARGRGAAAGAAGT 5'-GGGACDTTYCTTARTCCTGT
Н2	прямой Н2-422 обратный Н2-1083	5'-GAGAAARTWAAGATTCTGCC 5'-CCAAACAAYCCYCTTGAYTC
Н3	прямой Н3-175 обратный Н3-896	5'-CARATTGARGTGACHAATGC 5'-GGTGCATCTGAYCTCATTA
Н4	прямой Н4-8	5'-GCAGGGGAAACAATGCTATC

	обратный H4-777	5`-CCWGGYTCTACAATWGTCC
H5	прямой H5-155 обратный H5-699	5`-ACACATGCYCARGACATACT 5`-CTYTGRTTYAGTGTTGATGT
H6	прямой H6-661 обратный H6-962	5`-AGCATGAATTTTGCCAAGAG 5`-GGRCATTCTCCTATCCACAG
H7	прямой H7-12 обратный H7-645	5`-GGGATACAAAATGAAYACTC 5`-CCATABARYYTRGTCTGYTC
H8	прямой H8-166 обратный H8-597	5`-GTGGAAACAGAGAAACAT 5`-CCATAAGAARATGATGTCT
H9	прямой H9-151 обратный H9-638	5`-CTYCACACAGARCACAATGG 5`-GTCACACTTGTGTGTRTC
H10	прямой H10-521 обратный H10-932	5`-GGACAAAAYTTCCTCAGAC 5`-GRAAAGGGAGCTTTGTATTT
H11	прямой H11-240 обратный H11-689	5`-TGYTCMTTGTGCTGGRTGGAT 5`-CTCTGAACCCACTGCTACAT
H12	прямой H12-11 обратный H12-431	5`-AGGGGTCACAATGGAAAAA 5`-GGTGAAATCAAACATCTTCA
H13	прямой H13-203 обратный H13-433	5`CCACACAGGAACATAYTGTTCC 5`-CTACTGAAWGAYCTGATTCC
H14	прямой H14-444 обратный H14-986	5`-TCATCGCCGAACAATTCACC 5`-GCAGTTTCTATAGCAATCC
H15	прямой H15-455 обратный H15-837	5`-GTGCGTGTAAGAGAACAGTG 5`-ATTAGAGCGGAGAAAGGTGG

Таблица 4 - Подтипспецифичные праймеры на NA ген (Бао-Feng Qiu et al. 2008)		
NA Субтип	Место гибридизации праймера(5`)	Последовательность праймера
N1	прямой N1-1012 обратный N1-1257	5`-GAACAGGCAGTTGTGGTC 5`-TYAGTTCTGGATGCTGGAC
N2	прямой N2-495 обратный N2-808	5`-TCCGTTTCATTTGGGAACC 5`-CTGACAATGGRCTAATGTG
N3	прямой N3-999 обратный N3-1365	5`-ATCATGTGAYTCYCCAAG 5`-TCCCGATCCAGGTTTCAT
N4	прямой N4-821 обратный N4-1264	5`-CTGTTGTCTCYCCTCTAATGC 5`-ATGTGGATGCAACAGGGTTC
N5	прямой N5-152 обратный N5-814	5`-AYCCTGCAACACCACTGAG 5`-TCTCTTTCATTTGTCACCAT
N6	прямой N6-1041 обратный N6-1386	5`-AYCCTGCAACACCACTGAG 5`-TCTCTTTCATTTGTCACCAT
N7	прямой N7-1148 обратный N7-1403	5`-ATGYTGAARATACCYAATGC 5`-ARGAACCRGACCCAACTG
N8	прямой N8-162 обратный N8-523	5`-ACAGTCRRTTAGGGAATAC 5`-TACACATTGGGTGATTG
N9	прямой N9-1030 обратный N9-1395	5`-GTTCCATTGTCCAAGGAATTC 5`-TGTAATGACCCTTATCCAGG

Результат амплификации считали достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения РНК. Результаты интерпретировали на основании отсутствия или наличия пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

### 2.13 Пробоподготовка образцов и полногеномное секвенирование

Метод пробоподготовки образцов для секвенирования основан на получении полноразмерных ампликонов всех сегментов РНК вируса гриппа А при помощи ПЦР и дальнейшей подготовки библиотек для проведения полногеномного секвенирования. Реакцию ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Для проведения одной реакции использовали:

1. 2 мкл кДНК, предназначенной для секвенирования. Концентрация ДНК 2-6 нанограмм в мкл.
2. 10 мкл реакционной смеси «БиоМастер LR HS-ПЦР» (ООО "БИОЛАБМИКС", Россия);
3. 1 мкл раствора праймеров с концентрацией 6 пикомоль в мкл;
4. 7 мкл воды, свободной от РНКаз и ДНКаз.

Для секвенирования генома вируса гриппа А ПЦР-фрагменты должны быть получены при использовании следующих праймеров:

Таблица 5. праймеры для получения ПЦР-фрагментов для секвенирования

M13uni-12.4	TGTA AACGACGGCCAGTAGCGAAAGCAGG
M13uni-12	TGTA AACGACGGCCAGTAGCAAAGCAGG
M13uni-13	CAGGAAACAGCTATGACCAGTAGAAACAAGG

Подготовку нуклеиновых кислот к секвенированию проводили в следующем порядке:

Пробирки с образцами помещали в амплификатор и запускали программу температурного циклинга (реакция секвенирования):

Таблица 6. Программа температурного циклинга для реакции секвенирования

Стадии	Температура, °С	Время, секунды	Количество циклов
Предварительная денатурация	94	100	1

Денатурация	94	10	10
Отжиг	41	20	
Элонгация	68	160	
Денатурация	94	10	30
Отжиг	61	20	
Элонгация	68	160	
Элонгация	68	250	1

Реакционные смеси после проведения амплификации хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  не больше месяца.

После завершения ПЦР реакционные смеси очищали от свободных праймеров. Для этого использовали набор QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) для очистки ДНК из реакционных смесей в соответствии с инструкцией производителя. Очищенные образцы (15мкл) переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и передавали в отдел геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора для полногеномного секвенирования, где осуществлялись следующие этапы:

1. Проводили измерение концентрации ДНК в образцах при помощи набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Для этого смешивали Qubit dsDNA HS реагент с Qubit dsDNA HS буфером в соотношении 1:200. Далее к 190 мкл полученного раствора добавляли 10 мкл первого стандартного образца и тщательно перемешивали. Аналогичную процедуру проводили со вторым стандартным образцом. Образцы для измерения концентрации ДНК в количестве 2 мкл смешивали с 198 мкл приготовленного раствора (Qubit dsDNA HS реагент смешанный с Qubit dsDNA HS буфером). Приготовленные таким образом пробы инкубировали при комнатной температуре в течение 2 мин, далее проводили калибровку флуориметра при помощи стандартных образцов, после чего измеряли концентрацию двуцепочечной ДНК в пробах.
2. Проводили ферментативную фрагментацию ДНК. Объем одного образца для фрагментации составлял 16 мкл и содержал количество ДНК в диапазоне 5 нг-3 мкг. В реакции добавляли максимальное количество

ДНК для каждой пробы, которое возможно добавить исходя из измеренной концентрации для образца, но в диапазоне 5 нг-3 мкг. В работе использовали фрагментазу NEBNext (New England Biolabs, США):

- 2.1 Перемешивали NEBNext фрагментазу в течение 3 сек, быстро центрифугировали и держали на льду.
  - 2.2 Смешивали в пробирке 1-16 мкл ДНК (5 нг-3 мкг), 2мкл 10x реакционного буфера v2, доводили до 18мкл стерильной водой
  - 2.3 Добавляли 2 мкл фрагментазы.
  - 2.4 Инкубировали при 37 °С в течение 20 мин.
  - 2.5 Добавляли 5мкл 0,5М ЭДТА.
3. Проводили очистку продуктов гидролиза при помощи набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Нидерланды). К 25мкл реакционной смеси добавляли 125мкл буфера PB. Раствор наносили на сорбирующий слой колонки и центрифугировали при 13000g в течение 1 минуты. Элюат удаляли, сорбирующий слой колонки промывали 750 мкл раствора PE центрифугированием при 13000g в течение 1 мин. ДНК-материал элюировали с колонки 60 мкл раствора TE центрифугированием при 13000g в течение 1 мин.
4. Для подготовки библиотек в работе использовали набор NEBNext® Ultra™ II в комплекте с магнитными частицами для очистки (New England Biolabs, США). Подготовку проводили по следующей схеме:
- 4.1 Смешивали в микропробирке 50мкл фрагментированной ДНК, 3мкл NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix, 7мкл NEBNext Ultra II End Prep, 7мкл Reaction Buffer и тщательно перемешивали пипетированием.
  - 4.2 Пробирку помещали в амплификатор с температурой крышки не менее 75 °С. Термоциклировали по схеме 30мин при 20 °С, 30мин при 65 °С.
5. Проводили лигирование адаптера к фрагментам ДНК:

5.1 В реакционную смесь, очищенную от свободных праймеров, добавляли следующие компоненты: 60 мкл реакционной смеси, 30 мкл NEBNext Ultra II Ligation Master Mix, 1 мкл NEBNext Ligation Enhancer, 2.5 мкл NEBNext Adaptor for Illumina и тщательно перемешивали пипетированием.

5.2 Инкубировали 15 мин при 20 °С в амплификаторе.

5.3 Добавляли в лигазную смесь 3 мкл USER™ Enzyme, тщательно перемешивали и инкубировали 15 мин при 37 °С в амплификаторе.

6. Проводили очистку ДНК после лигирования адаптера:

6.1 Ресуспендировали магнитные частицы и добавляли 87 мкл суспензии к лигазной смеси, после чего тщательно перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре.

6.2 Убирали супернатант, стараясь не затрагивать частицы.

6.3 Добавляли 200 мкл 80 % этилового спирта, не снимая со штатива, затем аккуратно отбирали супернатант, стараясь не затрагивать магнитные частицы. Данный шаг повторяли дважды. После чего просушивали в течение 5 мин.

6.4 Снимали планшет с магнитного штатива и добавляли для элюции 40 мкл 10 mM TrisHCl pH=8 или 0.1xTE, после чего тщательно перемешивали и выдерживали в течение 2 мин при комнатной температуре.

6.5 Помещали планшет на магнитный штатив на 5 мин, затем отбирали 15 мкл раствора ДНК в новую пробирку для амплификации.

7. Проводили амплификацию и кодирование образцов. В работе использовали NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (96 Index Primers, NEB #E6609):

7.1 Добавляли в микропробирку следующие компоненты: 15 мкл ДНК с пришитыми адапторами, 25 мкл NEBNext Ultra II Q5 Master Mix, 10 мкл Index/Universal PCR Primer. Тщательно перемешивали.

7.2 Проводили термоциклирование по программе:

Первичная денатурация	98 °С 30 сек	1 цикл
Денатурация	98 °С 10 сек	} 3-11 циклов
Отжиг/элонгация	65 °С 75 сек	
Финальная элонгация	65 °С 5 мин	1 цикл
Хранение	4 °С	

Количество циклов зависело от количества вносимой ДНК.

**Количество ДНК    Количество циклов**

1 мкг	3
500 нг	3
100 нг	3
50 нг	3-4
10 нг	6-7
5 нг	7-8
1 нг	9-10
0.5 нг	10-11

8. Проводили очистку библиотек согласно пункту 6. Элюцию ДНК проводили в 55 мкл 10 mM TrisHCl pH=8 или 0.1x TE.

9. Осуществляли валидацию библиотек и пулирование. Для этого проводили электрофоретическое разделение полученных библиотек в 2 % агарозном геле. Определяли средний размер библиотеки относительно маркера длин ДНК 100 bp («СибЭнзим», Россия). Затем измеряли концентрацию при помощи набора Qubit dsDNA HS Assay Kit («Invitrogen», США).

10. Каждую библиотеку разводили 10 mM TrisHCl до концентрации 4 нМ и смешивали по 5 мкл каждой библиотеки в 1,5 мл пробирке. Затем 5 мкл общей смеси библиотек (концентрация 4 нМ) смешивали с 5 мкл 0,2 N гидроксида натрия и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. К полученной смеси добавляли 990 мкл буфера HT1 (Hybridization Buffer), таким образом, получали библиотеку с концентрацией 20 пМ. Далее готовили библиотеку с концентрацией 12 пМ, смешивая 240 мкл буфера HT1 с 360 мкл библиотеки с концентрацией 20 пМ. Перемешали

пробу в картридж MiSeq Reagent Kit v3. Далее проводили секвенирование образцов на приборе MiSeq («Illumina», США).

#### **2.14. Статистическая обработка результатов**

Стандартную ошибку при расчете ИД50, ЛД50, ТСID50 вычисляли по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{p \cdot (1 - p)}{n}} ;$$

где  $p$  – распространенность, равная числу положительных образцов к общему количеству образцов ( $n$ ).

Доверительные пределы с вероятностью 95 % равны:  $p - 2S$  и  $p + 2S$

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Работа была выполнена в отделе зоонозных инфекций и гриппа Федерального бюджетного учреждения науки Государственный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора в период с 2013 по 2018 г.

В работе представлена система мониторинга Роспотребнадзора, которая обеспечивает сбор и анализ биологического материала от животных и людей на территории большого числа регионов Российской Федерации. Описаны результаты многолетнего мониторинга вируса гриппа птиц на территории Российской Федерации, которые включают исследование основных биологических и молекулярно-генетических свойств наиболее важных в эпидемиологическом и эпизоотологическом значении штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц, выделенных в данном исследовании.

За 6 лет на территориях большого числа регионов Российской Федерации было собрано около 50000 образцов биологического материала от людей и животных. Биоматериал был исследован на наличие вируса гриппа и его маркеров вирусологическими, молекулярно-биологическими и серологическими методами. Было выявлено более 160 штаммов вируса гриппа птиц различных подтипов, а также несколько вирусов гриппа подтипа H3N2, выделенных от свиней. При этом, наибольшее разнообразие ВГА было отмечено среди диких птиц, а наибольшее количество штаммов ВГА было выделено от домашних птиц, во время масштабной эпизоотии, вызванной высокопатогенным вирусом гриппа подтипа H5N8, зарегистрированной в период 2016-2018гг.

#### **3.1 Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2013 году**

В 2013 году на территории Российской Федерации была начата работа по углубленному мониторингу вируса гриппа птиц с пандемическим потенциалом. Основным регламентирующим документом новой системы

мониторинга являлся приказ Руководителя Роспотребнадзора № 714 от 30.09.2013г. «Об организации мониторинга за циркуляцией гриппа птиц», в рамках которого ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и региональные учреждения Роспотребнадзора осуществляли сбор и анализ биоматериала от животных и людей.

В 2013 году совместно с региональными лабораториями Роспотребнадзора было собрано 3468 образцов от диких и домашних птиц для исследования на наличие РНК вируса гриппа А (табл. 7). Биоматериала от людей, свиней или морских млекопитающих в 2013 году собрано не было.

Таблица 7. Результаты мониторинга вируса гриппа А в 2013г.

№№	Место сбора проб	Исследовано образцов		
		от диких птиц	от домашних птиц	Положительные пробы
1	Алтайский край	400		
2	Амурская область	9		
3	Забайкальский край	132		
4	Иркутская область	172		
5	Камчатский край	40		
6	Кемеровская область	9		
7	Красноярский край	33		
8	Магаданская область	20		
9	Новосибирская область	746	100	3 (А/Н?N9, А/Н3N8, А/Н4N6)*
10	Омская область	576		
11	Приморский край	286		
12	Республика Бурятия	299		
13	Республика Саха-Якутия	341		
14	Республика Тыва	13		
15	Сахалинская область	145		
16	Томская область	9		
17	Хабаровский край	57		
18	Чукотский АО	81		
	Всего	<b>3368</b>	<b>100</b>	<b>3</b>
Примечание: * - положительные пробы выявлены среди образцов от диких птиц				

Следует отметить, что из 37 регионов, участвующих в программе мониторинга вируса гриппа птиц, материал был собран и исследован только на территории 18 регионов. При этом количество собранного материала было разным. Так, наибольшее количество проб было собрано на территориях Новосибирской и Омской областей, Алтайского края и республики Саха-

Якутия, тогда как на территориях Амурской, Кемеровской и Томской областей было собрано только по 9 образцов биологического материала от диких птиц.

Пробы от птиц были представлены мазками из клоаки и трахеи, а также фрагментами внутренних органов птиц (трахеи, легких, кишечника, селезенки). Все 3468 проб биоматериала от диких и домашних птиц были исследованы методом ПЦР в реальном времени на содержание РНК вируса гриппа А. Было показано, что три образца являются положительными. Тем не менее, изоляцию вируса проводили из всех 1620 проб, поступивших в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, путем инокуляции биоматериала в аллантоисную полость РКЭ. Каждый образец был инокулирован в 3 РКЭ и инкубировался в течение 3-х суток при 37 °С. По истечении трех суток у всех РКЭ отбиралась аллантоисная жидкость и тестировалась на наличие вируса гриппа А при помощи серологических и молекулярно-биологических методов. Из положительных в ПЦР образцов выделить вирус гриппа не удалось ввиду низкой концентрации вируса в пробах. Тем не менее, фрагментарным секвенированием была определена принадлежность двух вирусов гриппа к подтипам А/Н3N8 и А/Н4N6. У третьего образца был определен только подтип нейраминидазы N9. Высокопатогенных вирусов гриппа H5, H7 и H9 подтипов в 2013 году выявлено не было.

Таким образом, за первый год исследований в рамках новой системы мониторинга удалось собрать и исследовать достаточное количество биоматериала с отдельных регионов, что обеспечило выявление положительных образцов несмотря на то, что сбор биологического материала был осуществлен менее чем в половине регионов России, в которых он был запланирован. То, что из положительных проб не удалось выделить вирус гриппа, вероятно, связано с возможными нарушениями условий транспортировки и хранения материала до его поступления в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Тем не менее, результаты уже показали определенную степень эффективности и необходимость продолжения исследований и совершенствования системы мониторинга.

### 3.2 Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2014 году

В 2014 году была продолжена работа по углубленному мониторингу вируса гриппа птиц с пандемическим потенциалом. Совместно с региональными учреждениями Роспотребнадзора было собрано и исследовано на наличие РНК вируса гриппа А 7782 образца от диких и домашних птиц (табл. 8). При этом, по сравнению с предыдущим годом, был существенно расширен сбор биологического материала от домашних птиц. Также была расширена география сбора образцов. Так, в 2014 году мониторинг вируса гриппа птиц осуществлялся на территории 26 регионов Российской Федерации.

Таблица 8. Результаты мониторинга вируса гриппа А в 2014г.

№№	Место сбора проб	Исследовано образцов		
		от диких птиц	от домашних птиц	Положительные пробы
1	Алтайский край	362	20	
2	Амурская область	126	0	
3	Астраханская область	0	150	
4	Забайкальский край	49	0	
5	Иркутская область	189	150	
6	Камчатский край	235	100	
7	Кемеровская область	180	300	
8	Краснодарский край	361	404	
9	Курганская область	60	100	
10	Магаданская область	36	0	
11	Новосибирская область	317	0	2 (H3N8)*
12	Омская область	160	160	
13	Оренбургская область	311	90	
14	Пермский край	0	18	
15	Приморский край	155	554	
16	Республика Коми»	46	533	
17	Республика Саха (Якутия)	604	231	1 (H5N8)*
18	Республика Татарстан	231	217	
19	Самарская область	0	100	
20	Сахалинская область	12	0	
21	Ставропольский край	216	150	
22	Томская область	152	160	
23	Тюменская область	18	150	
24	Хабаровский край	89	0	2 (H10N7, H13N6)*
25	Ханты-Мансийский АО	21	0	
26	Ямало-Ненецкий АО	88	178	
	<b>Всего</b>	<b>4017</b>	<b>3765</b>	<b>5</b>

Примечание: \* - вирус выделен из образцов от диких птиц.

Количество собранного биоматериала на разных территориях различалось. Так, больше всего образцов было собрано на территориях республик Саха (Якутия) и Коми, а также Приморского и Краснодарского краев. Наименьшее количество проб было собрано на территориях Сахалинской области и Ханты-Мансийского автономного округа. Также, были регионы, на территории которых осуществлялся сбор биоматериала только от диких птиц, и регионы, где пробы были собраны только от домашних.

В результате исследования образцов методом ПЦР в режиме реального времени, в пяти пробах была выявлена РНК вируса гриппа А (табл. 8).

Все положительные пробы были взяты от диких птиц. В биоматериале от домашней птицы положительных образцов выявлено не было. В результате культивирования проб на РКЭ было выделено пять штаммов вируса гриппа А подтипов H3N8, H10N7, H13N6, а также впервые зарегистрированный на территории Российской Федерации подтип H5N8. При изучении биологических характеристик выделенных штаммов было показано, что все штаммы имеют высокую степень репродукции, которая отражалась в высоких показателях инфекционного титра (ЭИД<sub>50</sub>/мл) (табл. 9).

Таблица 9. Биологические свойства выделенных штаммов вируса гриппа А

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занамивира/озельтамивира
			РКЭ	Мыши линии Balb/c		
			lgЭИД <sub>50</sub> /мл, (M±Sm)*	ИД <sub>50</sub> , lgЭИД <sub>50</sub> /мл, (M±Sm)*	ЛД <sub>50</sub> , lgЭИД <sub>50</sub> /мл, (M±Sm)*	IC <sub>50</sub> , нМ
1.	A/mallard/Khabarovsk/12/2014	H10N7	8,7±0,3	>5.0	>5.0	0,67/0,09
2.	A/duck/Chany/616/2014	H3N8	6,8±0,4	>5.0	>5.0	0,45/0,05
3.	A/rook/Chany/606/2014	H3N8	7,0±0,5	>5.0	>5.0	0,57/0,05
4.	A/gull/Khabarovsk/7/2014	H13N6	7,8±0,4	>5.0	>5.0	0,51/0,07
5.	A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	6,2±0,5	2,9±0,5	4,1±0,4	1.00/0.33

Примечание: \*- M – среднее значения показателя, Sm – стандартное отклонение.  
ЭИД<sub>50</sub> – 50 % эмбриональная инфицирующая доза; ИД<sub>50</sub> - 50 % инфицирующая доза для мышей линии Balb/c; ЛД<sub>50</sub> – 50 % летальная доза для мышей линии Balb/c; IC<sub>50</sub> – 50% ингибирующая концентрация.

При изучении вирулентности выделенных штаммов на лабораторных животных было показано, что вирусы гриппа подтипов H3N8, H10N7 и H13N6 не обладали патогенностью для мышей, однако способны эффективно заражать животных, что было показано определением ИД<sub>50</sub> инфекционной

дозы. При этом штамм вируса гриппа A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) оказался высокопатогенным, в связи с чем он был изучен более детально.

Штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) был выделен из трахеи свиньи (*Anas penelope*), добытой на территории поселка Белая Гора в Республике Саха (Якутия). Штамм хорошо культивировался в 10-и дневных развивающихся куриных эмбрионах и обладал высокой степенью репродукции, показывая высокий титр вируса в аллантоисной жидкости. В реакции гемагглютинации максимальный титр вируса составил 5120 ГАЕ/мл. При титровании на РКЭ инфекционный титр вируса составил 6,2 lg ЭИД50. Антигенные свойства штамма исследованы в РТГА с сыворотками и антигенами штаммов вируса гриппа H5N1-подтипа различных клад, полученными во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Результаты представлены в табл. 10.

Как видно из таблицы, ни одна из референ-сывороток не имела в РТГА значимого титра со штаммом A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8). Антигенное взаимодействие отмечено только с сывороткой к штамму A/Common gull/Chany/2006 (H5N1) с обратным титром 20.

Табл. 10 Антигенные свойства штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8)

Штамм	Сыворотка					
	A/Goose/Krasnoozerskoye/627/05 (H5N1)	A/Common gull/Chany/2006 (H5N1)	A/chicken/Prymorsky/85/2008 (H5N1)	A/Black-Headed gull/Tyva/115/09 (H5N1)	A/Garganey/Altai/1213/2007 (H5N2)	A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8)
	Обратные титры антител					
A/Goose/Krasnoozerskoye/627/2005 (H5N1) клада 2.2	1280	1280	1280	320	<20	<20
A/Common gull/Chany/2006 (H5N1) клада 2.2	1280	10280	40	40	<20	<20
A/chicken/Prymorsky/85/2008 (H5N1) клада 2.3.2	640	<20	5120	1280	<20	<20
A/Black-Headed gull/Tyva/115/2009 (H5N1) клада 2.3.2	320	<20	1280	640	<20	<20
A/Garganey/Altai/1213/2007 (H5N2)	<20	320	<20	<20	320	<20
A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) клада 2.3.4.4	<20	20	<20	<20	<20	160

С целью определения патогенности штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) были определены количественные показатели инфекционности и вирулентности для лабораторных мышей. Величина 50%-ной инфекционной

дозы (ИД50) при интраназальном заражении мышей линии Balb/c составила 2,9 lg ЭИД50. Летальная доза (ЛД50) для мышей составила 4,1 lg ЕИД50, что указывает на наличие вирулентности исследуемого штамма для мышей.

После получения последовательностей всего генома штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) был проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов гемагглютинаина и нейраминидазы.

Анализ сайта протеолитического расщепления гемагглютинаина выявил аминокислотную последовательность PLRERRRKRGLF, которая является полиосновным сайтом протеолитического расщепления гемагглютинаина, что является одним из главных признаков высокой патогенности штамма. Это было подтверждено экспериментально.

Филогенетический анализ показал высокую степень идентичности генов НА и NA штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) с нуклеотидными последовательностями штаммов Евразийской линии, выделенных в том же году в Юго-восточной Азии от домашней птицы (рис. 12, 13).

Филогенетическое дерево гена НА выделенного штамма и штаммов других подтипов H5 указало на его принадлежность к генетической кладе 2.3.4.4 (рис. 12).

В результате анализа последовательности гена НА была выявлена замена, расположенная в сайте связывания антител, что указывает на антигенный дрейф гемагглютинаина H5 по отношению к ранее выделенным вариантам. В то время мутация A201E встречалась только один раз в штамме A/chicken/Egypt/Q1769B/2010 (H5N1), выделенном в Египте в мае 2010 года.

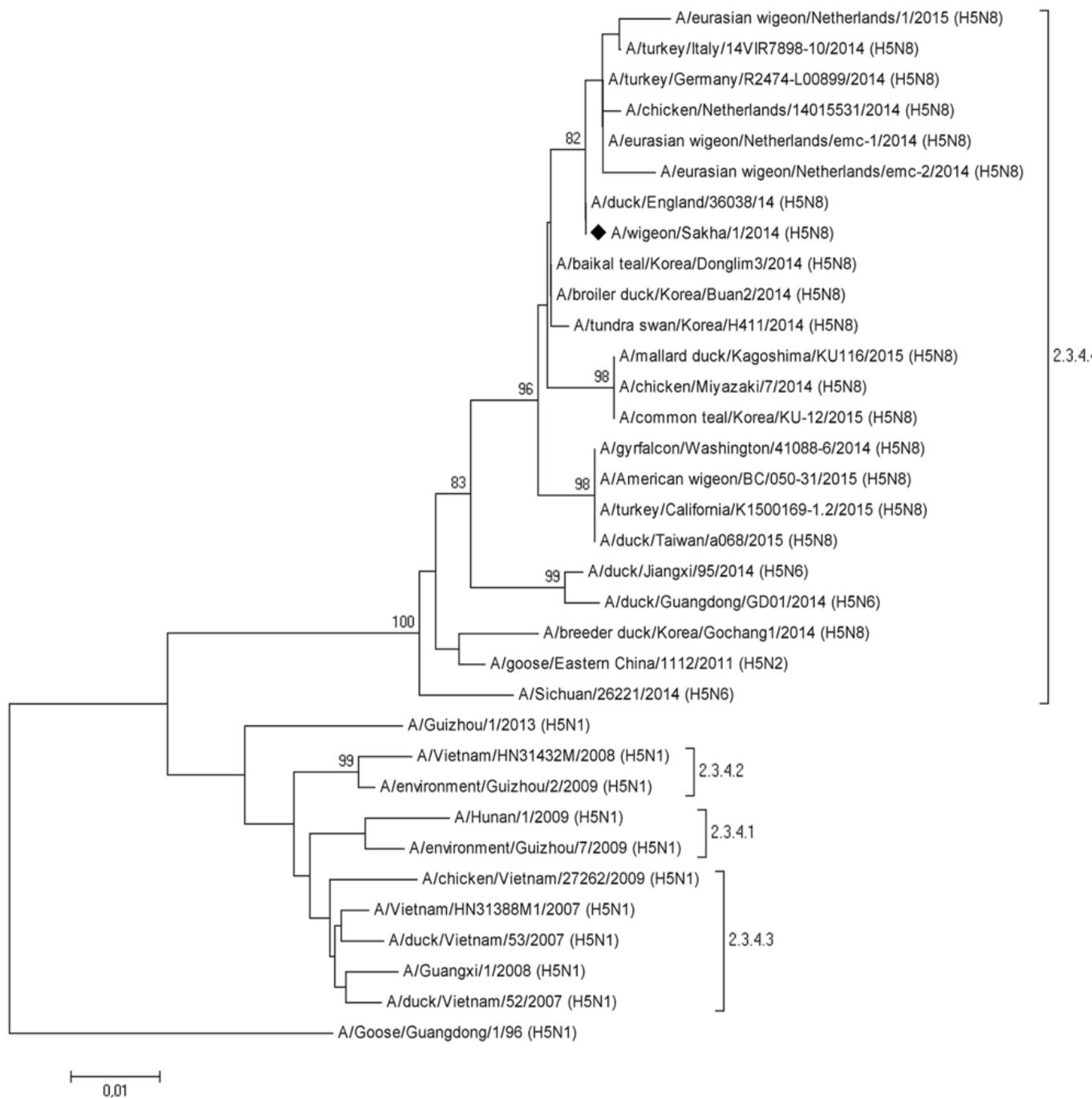


Рисунок 12. Филогенетическое дерево гена гемагглютинина HA(A) штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8). Дерево построено при помощи программы MEGA 5.0 ([www.megasoftware.net/](http://www.megasoftware.net/)) с использованием метода minimum evolution (1000 повторов).

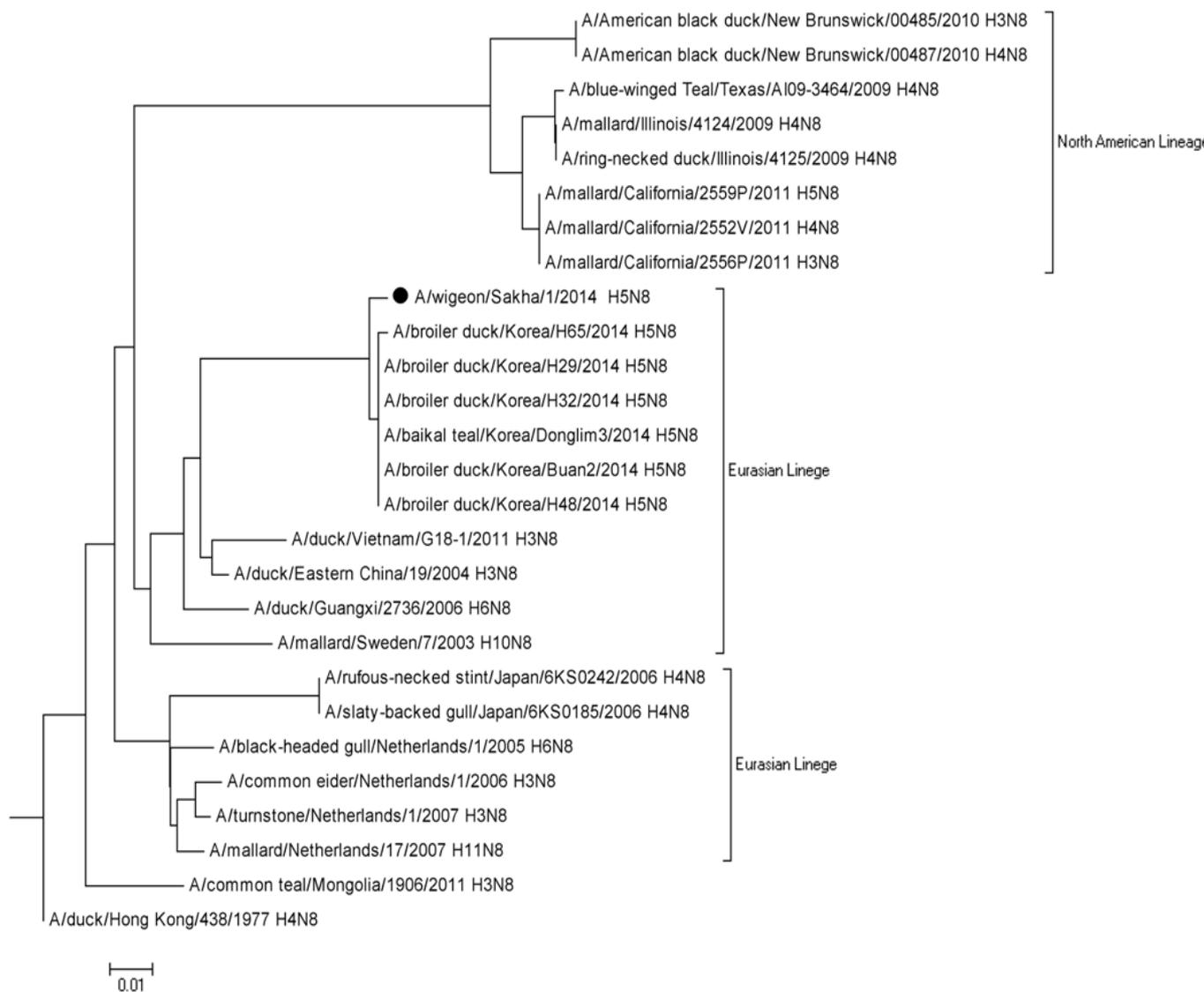


Рисунок 13. Филогенетическое дерево гена нейраминидазы (NA) штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8). Дерево построено при помощи программы MEGA 5.0 ([www.megasoftware.net/](http://www.megasoftware.net/)) с использованием метода minimum evolution (1000 повторов).

В NA было выявлено 2 замены A190T и G271R, которые отличают его от консенсусной последовательности нейраминидазы N8, и, возможно, мутация G271R может влиять на резистентность к ингибиторам нейраминидазы. Однако, результаты наших исследований активности нейраминидазы штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) в присутствии препаратов занамивир и озельтамивир показали, что 50% ингибирующая доза препарата озельтамивир составила 1,00 нМ, занамивира – 0,33 нМ, что по критериям ВОЗ позволяет отнести этот штамм к разряду

высококочувствительных к ингибиторам нейраминидазы. Полученные данные имеют важное значение для оценки возможного пандемического риска циркулирующего вируса гриппа А(Н5N8).

Таким образом, в 2014 году, в ходе мониторинга ВГП на территории России, было существенно увеличено количество собранного и обследованного биоматериала. Отчасти, это было связано с тем, что по сравнению с 2013 годом было увеличено количество регионов России, в которых был осуществлен сбор биоматериала. Помимо этого, в 2014 году в 19 регионах был осуществлен сбор биологического материала от домашней птицы (табл. 8). Ключевым результатом мониторинга вируса гриппа в 2014 году является выделение и исследование высокопатогенного вируса A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8). Полученные данные указали на необходимость дальнейшего совершенствования системы мониторинга и осуществления сбора и анализа биологического материала от людей, чему впоследствии было уделено особое внимание.

### **3.3 Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2015 году**

В ходе мониторинга вируса гриппа птиц на территории Российской Федерации в 2015 году совместно с региональными лабораториями Роспотребнадзора было собрано и изучено на наличие РНК вируса гриппа А 7930 проб (табл. 11). При этом, биоматериал был представлен не только образцами от птиц, но также был осуществлен сбор мазков из носа от свиней и морских млекопитающих. Биоматериал от свиней был собран на территории Новосибирской области, а материал от морских млекопитающих – морского зайца (*Erignathus barbatus*) и ларги (*Phoca largha*), был собран на территории Камчатского края и Магаданской области. Помимо этого, в 2015 году начался сбор и анализ биоматериала от людей, по роду своей деятельности контактирующих с дикой или домашней птицей.

В 2015 году мониторинг вируса гриппа птиц осуществлялся на территории 22 регионов Российской Федерации. Наибольшее количество проб

биоматериала было собрано на территории республик Бурятия и Татарстан, Ямало-Ненецкого автономного округа и Омской области, тогда как на территории Алтайского края, республик Коми и Саха (Якутия) было собрано только 12, 13 и 6 образцов от диких птиц соответственно. Из 648 проб биоматериала, взятых на территории республики Бурятия, все были представлены пробами от диких птиц.

Таблица 11. Результаты мониторинга вируса гриппа А в 2015г.

№	Место сбора проб	Исследовано образцов					Положительные пробы
		от диких птиц	от домашних птиц	От свиней	От морских млекопитающих	От людей	
1	Алтайский край	12				100	
2	Астраханская область	96	200			200	
3	Иркутская область	200	153			200	
4	Камчатский край	125	50		46	150	
5	Кемеровская область	72	150			200	
6	Магаданская область	66			16	40	
7	Новосибирская область	257	79	54		91	7 (H5N1)*
8	Омская область	244	240			120	
9	Оренбургская область	252	100			150	
10	Пермский край	54	46			120	
11	Республика Бурятия	648				150	
12	Республика Коми	13					
13	Республика Саха (Якутия)	6				200	
14	Республика Татарстан	273	300			200	
15	Самарская область	14	100			200	
16	Саратовская область	84	39			60	
17	Сахалинская область	60				10	
18	Свердловская область	30				10	
19	Ставропольский край	108	120			100	
20	Тюменская область		150			200	
21	Ямало-Ненецкий АО	300	258			150	
22	Хабаровский край	64				200	
	<b>Всего</b>	<b>2978</b>	<b>1985</b>	<b>54</b>	<b>62</b>	<b>2851</b>	

Примечание: \* - вирус выделен из образцов от диких птиц.

В результате исследования биоматериала от людей, свиней, морских млекопитающих и домашних птиц вируса гриппа в образцах выявлено не было. В то же время, в ходе мониторинга вируса гриппа от диких птиц, включая несколько клинически здоровых грачей (*Corvus frugilegus*), добытых на территории трех районов Новосибирской области, на РКЭ было выделено семь штаммов вируса гриппа H5N1. Штаммы были выделены на 9-дневных

развивающихся куриных эмбрионах и показали высокую степень продуктивности, а также высокие значения показателей инфекционности и вирулентности для млекопитающих (мыши) (табл. 12). Так, в среднем, при титровании на РКЭ инфекционный титр вируса составил 8,9 lg ЭИД<sub>50</sub>. Для дальнейшего изучения и сравнения были выбраны три штамма из трех регионов Новосибирской области.

При интраназальном заражении мышей линии Balb/c летальная доза (ЛД<sub>50</sub>) составила 2,8, 2,7 и 3,6 lg ЭИД<sub>50</sub> для штаммов A/rook/Chany/32/2015, A/rook/Sartlan/42/2015 и A/rook/Dovolnoe/50/2015 соответственно, что указывает на высокую степень вирулентности для мышей.

Таблица 12. Некоторые биологические характеристики вирусов гриппа H5N1

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занамивира/озельтамивира
			РКЭ	Мыши линии Balb/c		
			lgЭИД <sub>50</sub> /мл, (M±Sm)*	ИД <sub>50</sub> , lgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	ЛД <sub>50</sub> , lgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	IC50, nM
<b>Ранее выделенные штаммы</b>						
	A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	6.2 ± 0.5	2.9 ± 0.4	4.1 ± 0.4	1.00/0.33
<b>Исследуемые штаммы</b>						
1	A/mallard/Chany/31/2015	H5N1	8,9±0,32	н/д	н/д	0,37/0,14
2	A/rook/Chany/32/2015	H5N1	8,7±0,39	1,9±0,39	2,88±0,88	0,35/0,55
3	A/rook/Chany/33/2015	H5N1	9,1±0,55	н/д	н/д	0,4/0,18
4	A/crane/Chany/34/2015	H5N1	8,7±0,39	н/д	н/д	0,38/0,37
5	A/duck/Chany/35/2015	H5N1	8,9±0,78	н/д	н/д	0,42/0,37
6	A/rook/Sartlan/42/2015	H5N1	9,1±0,55	1,8±0,33	2,68±0,78	0,39/0,42
7	A/rook/Dovolnoe/50/2015	H5N1	9,5±0,48	2,1±0,39	3,55±0,63	0,49/0,33
Примечание: *- M – среднее значения показателя, Sm – стандартное отклонение. ЭИД <sub>50</sub> – 50 % эмбриональная инфицирующая доза; ИД <sub>50</sub> - 50 % инфицирующая доза для мышей линии Balb/c; ЛД <sub>50</sub> – 50 % летальная доза для мышей линии Balb/c; IC50 – 50% ингибирующая концентрация, н/д – исследования не проводились.						

Антигенные свойства штаммов были изучены в реакции торможения гемагглютинации (табл. 13). Были использованы штаммы вируса гриппа H5-подтипа, ранее циркулировавшие в России, а также референс-сыворотки хорьков, полученные на штаммы вируса гриппа H5 различных клад. Как видно из таблицы, наибольшее антигенное сродство изучаемые штаммы имеют со штаммами клады 2.3.2, циркулировавшими ранее на территории Российской

Федерации в 2008-2009 г. При этом, с циркулировавшим в 2014 году штаммом A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) антигенного сродства выявлено не было.

Таблица 13. Антигенные свойства штаммов H5Nx, выявленных в Новосибирской области

Штамм	Подтип	Клада	Сыворотка											
			A/goose/Krasnoozerskoye/627/05	A/common gull/Chany/2006	A/great crested grebe/Tuva/120/2009	A/rook/Chany/32/2015	A/Hong Kong/2013/2003	A/duck/Hunan/795/2002	A/duck/Tuva/01/2006	A/barheaded goose/Qinghai/1A/2005	A/duck/Hunan/101/2004	A/chicken/Primorje/1/2008	A/Muscovy duck/Vietnam/1455/2006	A/Japanese white-eye/HK/1038/2006
			2.2	2.2	2.3.2	2.3.2	1	2.1	2.2	2.2	2.3.1	2.3.2	2.3.2	2.3.4
Обратные титры антител														
A/goose/Krasnoozerskoye/627/05	H5N1	2.2	160	20	<20	160	<20	320	80	320	160	20	160	20
A/common gull/Chany/2006	H5N1	2.2	80	1280	<20	80	<20	160	320	160	160	<20	40	40
A/great crested grebe/Tuva/120/2009	H5N1	2.3.2	160	20	320	320	<20	320	<20	160	80	640	640	20
A/rook/Chany/32/2015	H5N1	2.3.2	20	20	40	640	<20	40	<20	40	20	80	20	<20
A/rook/Sartlan/42/2015	H5N1	2.3.2	160	80	320	320	<20	160	<20	160	160	640	160	40
A/rook/Dovolnoe/50/2015	H5N1	2.3.2	160	80	320	320	<20	160	<20	160	160	640	160	20
A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	2.3.4.4	<20	160	<20	<20	320	40	640	640	320	<20	320	640

Полученные данные согласуются с результатами молекулярно-биологических исследований. Нами получены последовательности всех сегментов геномов трех штаммов вируса гриппа A(H5N1). Последовательности депонированы в базе GISAID под инвентарными номерами, представленными в Приложении 1. Филогенетический анализ гена НА изучаемых штаммов показал принадлежность данных штаммов к генетической кладе 2.3.2, субкладе 2.3.2.1с. В корне дерева был взят штамм A/chicken/Guangxi/604/2005 как корневой представитель клады 2.3.2. Для сравнения были использованы последовательности штаммов из разных регионов мира, депонированные в базе данных GISAID. Штаммы, выделенные в Новосибирской области, отнесенные к кладе 2.3.2.1с, имеют тесное сродство с группой кандидатного вакцинного штамма A/Alberta/1/2014 (H5N1), рекомендованного ВОЗ в 2015 году (Рис. 14).

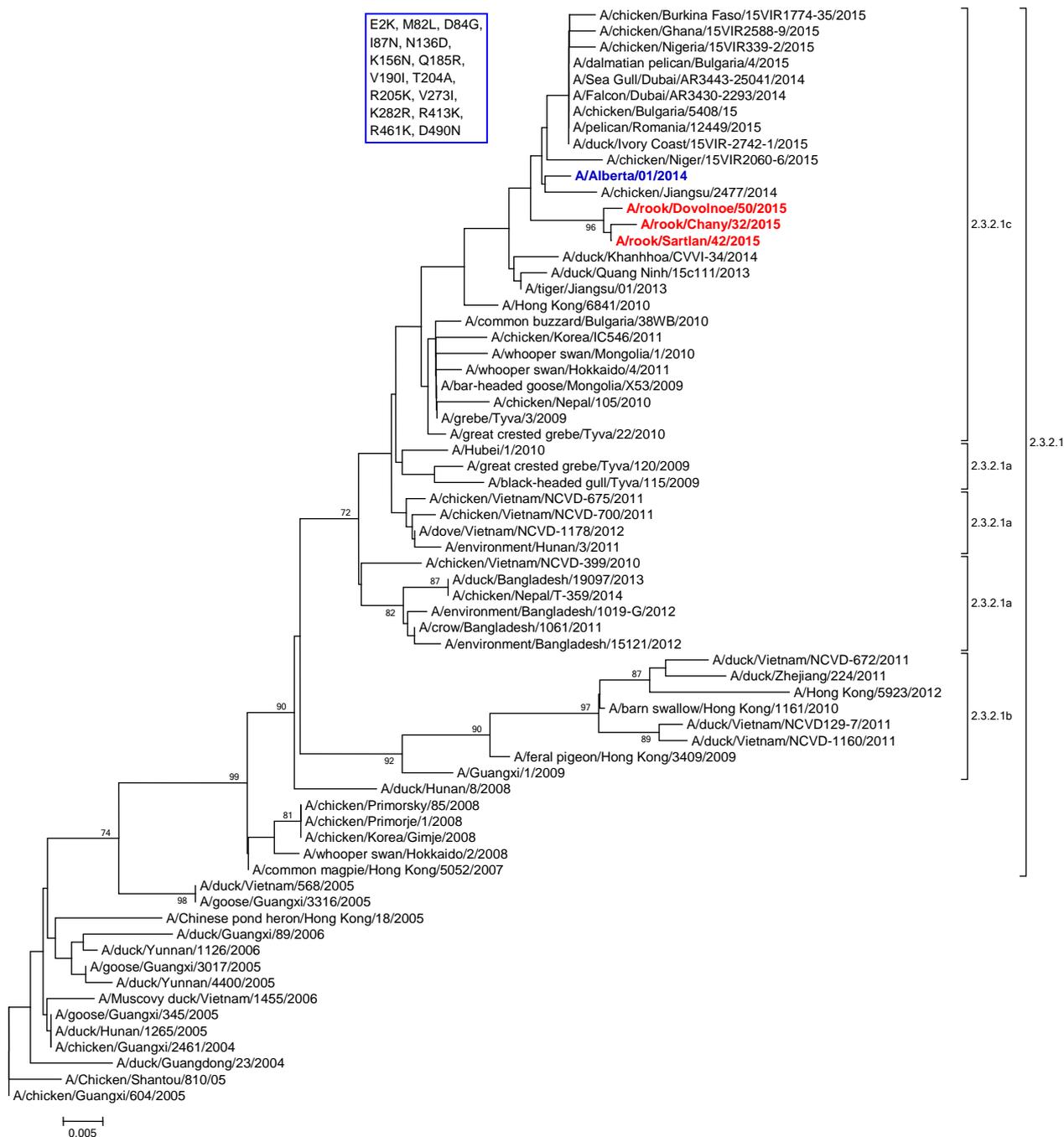


Рисунок 14. Филогенетическое дерево гена HA1 штаммов вируса гриппа А(Н5N1). Штаммы, выявленные в Новосибирской области выделены красным. Замены в аминокислотной последовательности HA выделенных штаммов, имеющие связь с референс штаммом А/Hubei/1/2010 (выделен синим), показаны в рамке. Филогенетическое дерево было построено с помощью программного обеспечения MEGA версии 5.2 ([www.megasoftware.net/](http://www.megasoftware.net/)) с использованием метода neighbor-joining (1,000 повторов) с Kimura 2-parameter model.

Анализ нуклеотидных последовательностей всех восьми сегментов геномов штаммов, выявленных в Новосибирской области, показал, что выделенные нами вирусы являются реассортантами между вирусами подтипов

H5N1 и H9N2 по сегменту PB2 (рис. 15), то есть, данный сегмент эволюционно получен от вируса гриппа подтипа H9N2.

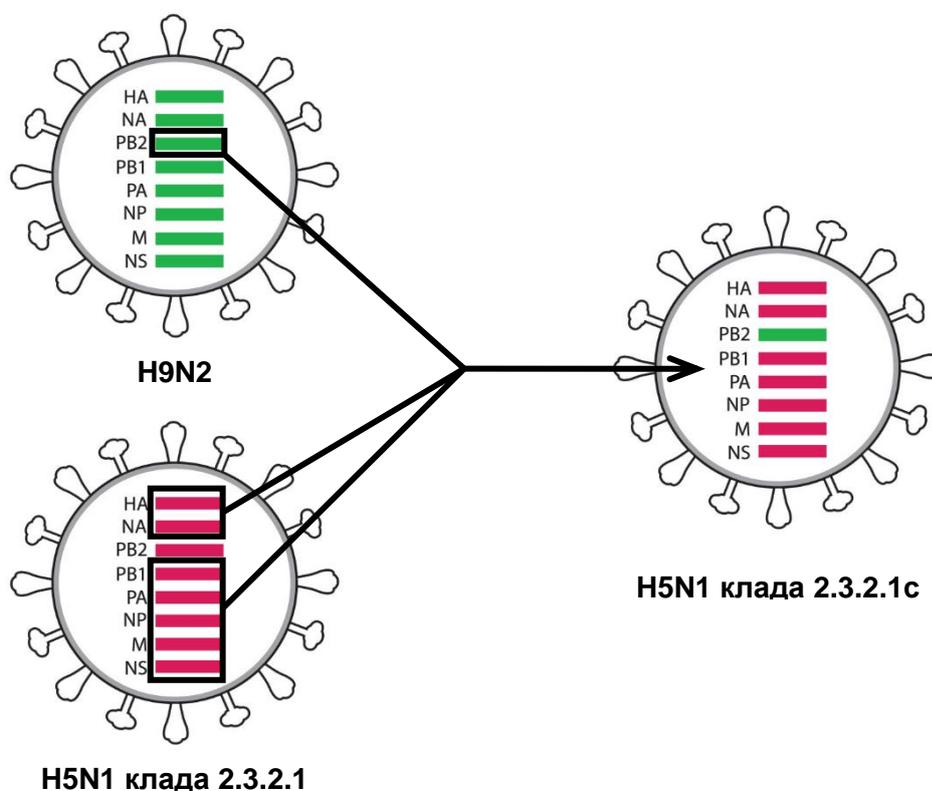


Рисунок 15. Схематическое изображение реассортации штаммов вируса гриппа A(H5N1), выявленных в Новосибирской области.

Анализ последовательности гемагглютинина (HA) выявил мутации, потенциально обуславливающие небольшой антигенный дрейф изучаемых изолятов внутри группы штаммов субклады 2.3.2.1. Также присутствуют мутации, способствующие аттенуации, т.е. снижению патогенности. Присутствуют мутации, обуславливающие лекарственную устойчивость, причем в выраженной степени для адамантанов и в невыраженной для ингибиторов нейраминидазы. В целом, в геноме этих изолятов, отражены мутации, характерные для гриппа птичьего типа, однако отмечены две мутации в HA - A149S (A/rook/Dovolnoe/50/2015) и G146W(A/rook/Chany/32/2015) обуславливающие потенцию для рецепторного взаимодействия с сиалозидами  $\alpha$ 2-6. Обнаружены две мутации в гене нейраминидазы (NA) в позициях 41 и 135, которые, по литературным данным,

отвечают за устойчивость к лекарственным препаратам (табл. 14 и 15). Чувствительность исследуемых штаммов к ингибиторам нейраминидазы подтверждается результатами исследования нейраминидазной активности при помощи флуорометрического метода (Fluorometric Neuraminidase Inhibition Assay). Так, 50% ингибирующая доза (IC<sub>50</sub>) занамивира/озельтамивира в отношении изучаемых штаммов составила 0,35/0,55 нМ для штамма A/rook/Chany/32/2015 и 0,39/0,42 нМ и 0,49/0,33 нМ для штаммов A/rook/Sartlan/42/2015, A/rook/Dovolnoe/50/2015 соответственно.

Следует отметить, что изученные нами штаммы имеют незначительные антигенные отличия (табл. 13), что свидетельствует о возможном антигенном дрейфе внутри клады 2.3.2.1. Так, например, исследования лекарственной устойчивости, показали, что штаммы A/rook/Chany/32/2015 и A/rook/Sartlan/42/2015 чуть менее чувствительны к озельтамивиру, что может свидетельствовать о начале приобретения штаммами устойчивости, о чем также свидетельствуют выявленные аминокислотные замены.

Таблица 14. Мутации, выявленные в генах HA и NA трех штаммов вируса гриппа А(Н5N1) в сравнении с кандидатным вакцинным штаммом А/Hubei/1/2010(Н5N1)

Штамм	а.к. замена в гене HA																
	2	82	84	87	136	146	149	156	185	190	204	205	273	282	413	461	490
A/Hubei/1/2010	E	M	D	I	N	G	A	K	Q	V	T	R	V	K	R	R	D
A/rook/Chany/32/2015	K	L	G	N	D	W	A	N	R	I	A	K	I	R	K	K	N
A/rook/Dovolnoe/50/2015	K	L	G	N	D	G	S	N	R	I	A	K	I	R	K	K	N
A/rook/Sartlan/42/2015	K	L	G	N	D	G	A	N	R	I	A	K	I	R	K	K	N

Штамм	а.к. замена в гене NA															
	15	20	29	41	54	61	62	75	135*	168	172	238	264	312	320	
A/Hubei/1/2010	M	V	M	G	F	A	S	R	H	T	T	M	D	K	P	
A/rook/Chany/32/2015	I	I	I	E	S	T	P	K	H	A	I	I	E	T	S	
A/rook/Dovolnoe/50/2015	I	I	I	E	S	T	P	K	H	A	I	I	E	T	S	
A/rook/Sartlan/42/2015	I	I	I	E	S	T	P	K	H	A	I	I	E	T	S	

В таблице 16 представлен список конкретных мутаций, присутствующих во всех белках изученных штаммов. Анализ проведен с использованием сервисов H5N1 Genetic Changes Inventory (<http://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1/inventory.htm>) и FluServer in Global

Таблица 15: Анализ мутаций в аминокислотных последовательностях изученных штаммов H5N1

Мутация	Описание
HA K156N	Мутация, соответствующая позиции HA 156, была отмечена в литературе как отвечающая за антигенный дрейф/ «ускользнувший» мутант
HA T204A	Мутация, соответствующая позиции HA 204, была отмечена в литературе как отвечающая за антигенный сдвиг, определяющий круг хозяев.
HA A149S (A/rook/Dovolnoe/50/2015)	Повышенное взаимодействие с сиалозидами $\alpha$ 2-6
HA G146W (A/rook/Chany/32/2015)	Повышенное взаимодействие с сиалозидами $\alpha$ 2-6
HA R205K	Мутация, отвечающая за сниженную вирулентность для кур
M2 V27I	Мутация, соответствующая позиции M2 27 была отмечена в литературе как отвечающая за умеренную и высокую устойчивость к лекарственным препаратам.
M2 F47L	Мутация, влияющая на связывание с лекарственными препаратами адамантанового ряда
M2 S89G	Определение круга хозяев. N – консенсусная аминокислота для птиц, S – для человека
M2 A29T(A/rook/Sartlan/42/2015)	Мутация, описанная для штамма A/chicken/Egypt/S3802B/2011(H5N1), выделенного в сентябре 2011г.
NA H135	Умеренная устойчивость к Tamiflu и Relenza. Данная мутация найдена в штамме A/Hokkaido/15/2002 (H1N1)
NA G41E	Мутация, соответствующая позиции NA 41, была отмечена в литературе как отвечающая за умеренную устойчивость к лекарственным препаратам
NS2 M52V	Снижение противовирусного ответа хозяина
NP A373T	Мутация, вызывающая снижение потенции CTL
NS1 D87E	Мутация, отвечающая за повышенную вирулентность для мышей
NS1 S200N	Снижение противовирусного ответа хозяина
NS1 M217L	Мутация, отвечающая за повышенную вирулентность и патогенность для мышей
NS1 T220A	Мутация, отвечающая за повышенную вирулентность и патогенность для мышей
PB1 N328S	Мутация, отвечающая за снижение эффективности репликации и вирулентности для хорьков
PB2 V495A	Мутация, отвечающая за пониженную вирулентность для мышей
PB2 K627E	Мутация, отмеченная, как маркер видовой принадлежности

Результаты, полученные в 2015 году, указывают на то, что система мониторинга ВГП на территории России с каждым годом становится более эффективным механизмом наблюдения за вирусом гриппа, который позволил выявить циркуляцию вируса гриппа H5N1 на территории новосибирской

области. Несмотря на то, что в 2015 году сбор биоматериала был осуществлен на территории 22 регионов России (против 26 регионов в 2014 году), в 2015 году удалось обеспечить сбор проб от свиней и морских млекопитающих, а также значительного количества биоматериала от людей. В биоматериале от людей не было выявлено маркеров ВГП, однако, данные о циркуляции в 2014 и 2015 гг. высокопатогенных вариантов ВГП подчеркивают важность продолжения исследований среди животных и людей.

### **3.4 Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2016 году**

В ходе мониторинга вируса гриппа птиц на территории Российской Федерации в 2016 году совместно с региональными лабораториями Роспотребнадзора было собрано и изучено на наличие РНК вируса гриппа А 12775 проб. Биоматериал был представлен образцами от диких и домашних птиц, мазками из носа от свиней и морских млекопитающих, а также мазками от людей, по роду своей деятельности контактирующих с дикой или домашней птицей. Биоматериал от свиней в 2016 году был собран на территории шести регионов Российской Федерации, а материал от морских млекопитающих был собран только на территории Магаданской области.

В 2016 году мониторинг вируса гриппа птиц осуществлялся на территории 32 регионов Российской Федерации. При этом основное количество проб биоматериала было собрано в весенний период 2016 года. Наибольшее количество проб биоматериала было собрано на территориях Приморского и Забайкальского краев, в республике Бурятия и Оренбургской области. Наименьшее количество проб было собрано на территориях Хабаровского края, Сахалинской области и республики Коми (табл. 16).

Таблица 16. Результаты мониторинга вируса гриппа А в 2016г.

№№	Регион сбора проб	Исследовано образцов										Выделено вирусов гриппа
		от диких птиц		от домашних птиц		От свиней		От морских млекопитающих		От людей		
		Весна	Осень	Весна	Осень	Весна	Осень	Весна	Осень	Весна	Осень	
1.	Алтайский край	24	108									1 (H5N8)*
2.	Амурская область		157									
3.	Астраханская область		70	100								5 (H5N8)#
4.	Забайкальский край	319		798						104		
5.	Иркутская область	65	200	80	150					100	200	
6.	Камчатский край	75	275	50	50					100	54	3 (H13N8)*, 1 (H5N5)*
7.	Кемеровская область	108	72	150	150					150	150	
8.	Краснодарский край	19	2		11	50					501	
9.	Красноярский край	60	150	105						65		
10.	Курганская область		47	40		50	50			90		1 (H5N8)*
11.	Магаданская область	66	65					4	16			
12.	Новосибирская область	158	161	186		30				50		4 (H6N1)*
13.	Омская область	50	50	120		50	50			100		
14.	Оренбургская область	288	324	100	100					100	100	
15.	Пермский край			96						65		
16.	Приморский край	505		300						457		
17.	Республика Алтай	50								50		
18.	Республика Бурятия	440	438							80	70	
19.	Республика Калмыкия	60										5 (H5N8)#
20.	Республика Коми	10										
21.	Республика Татарстан	10										1 (H5N8)*
22.	Республика Тыва	66										5 (H5N8)*
23.	Республика Хакасия	30								100		
24.	Самарская область	10		100						50		
25.	Саратовская область	89		10								
26.	Сахалинская область	35										
27.	Ставропольский край	108	108	120	120		50			50		
28.	Томская область	160	209	40			100			160		
29.	Тюменская область		9	150	150					100	200	
30.	Хабаровский край	39										
31.	Чукотский АО	50										
32.	Ямало-Ненецкий АО	80	100	65	65					81	73	
	<b>ИТОГО: 12775</b>	<b>2974</b>	<b>2545</b>	<b>2610</b>	<b>796</b>	<b>180</b>	<b>250</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	<b>2052</b>	<b>1348</b>	<b>26</b>

Примечание: \* - вирус выделен из образцов от диких птиц; # - вирус выделен из образцов от домашних птиц.

В результате исследования в 26 образцах было выявлено наличие вирусов гриппа А (табл. 16). Данные вирусы относились к H6N1, H13N8, H5N5 и H5N8 подтипам. Так, в мае 2016 года на территории Камчатского края в помете тихоокеанских чаек (*Larus schistisagus*) был обнаружен вирус гриппа H13N8. Также, в мае того же года на территории Республики Тыва была зафиксирована гибель диких птиц. На озере Убсу-нур были найдены трупы видов Серая цапля (*Ardea cinerea*), Чомга (*Podiceps cristatus*), Озерная чайка (*Larus ridibundus*), Крачка (*Sterna hirundo*) и один вид дикой утки, который впоследствии был определен как красноголовый нырок (*Aythya ferina*). Из биологического материала, взятого от погибших птиц, было выделено пять штаммов вируса гриппа. В результате типирования была определена принадлежность штаммов к подтипу H5N8 вируса гриппа. Затем, в августе 2016 года данный подтип был выявлен среди изолятов от диких птиц на территории Алтайского края и Курганской области. В октябре 2016 года вирус гриппа H5N8 был выделен от дикой утки в ходе мониторинга на территории республики Татарстан. В ноябре 2016 вирус гриппа был выделен на территории республики Калмыкия, где была отмечена гибель домашних кур на частных подворьях. В это же время была зарегистрирована вспышка вируса гриппа на птицефабрике «Харабалинская», г. Харабали, Астраханская область. Помимо этого, в сентябре на территории Новосибирской области от диких птиц был выделен вирус гриппа подтипа H6N1, а в октябре на территории Камчатского края среди диких птиц была зарегистрирована циркуляция вируса гриппа подтипов H13N8 и H5N5. У выделенных штаммов, включая вирусы подтипа H5N8 из разных регионов России, были изучены биологические свойства в сравнении со штаммами, ранее выделенными в России (табл. 17).

Таблица 17. Биологические свойства выделенных штаммов вируса гриппа А

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занамивира/озельтамивира
			РКЭ	Мыши линии Balb/c		
			lgЭИД <sub>50</sub> /мл, (M±Sm)*	ИД <sub>50</sub> , lgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	ЛД <sub>50</sub> , lgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	IC <sub>50</sub> , nM
<b>Ранее выделенные штаммы</b>						
1.	A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	6.2 ± 0.5	2.9 ± 0.4	4.1 ± 0.4	1.00/0.33
2.	A/rook/Chany/32/2015	H5N1	8.7 ± 0.4	1.9 ± 0.4	2.9 ± 0.8	0.35/0.55
<b>Исследуемые штаммы</b>						
1.	A/environment/Kamchatka/23/2016	H13N8	8,9 ± 0.4	>5.0	>5.0	1.9/0.4
2.	A/environment/Kamchatka/24/2016	H13N8	6,9± 0.6	>5.0	>5.0	0.8/0.6
3.	A/ black-headed gull /Tyva/41/2016	H5N8	8,7 ± 0.6	н/д	н/д	1.2/0.6
4.	A/wild duck/Tyva/35/2016	H5N8	7,9 ± 0.4	1.9 ± 0.6	2.2± 0.5	1.4/0.8
5.	A/great crested grebe/Tyva/34/2016	H5N8	9,3 ± 0.3	1.7 ± 0.5	2.3± 0.5	1.0/0.7
6.	A/grey heron/Tyva/20/2016	H5N8	7,9 ± 0.4	н/д	н/д	1.3/0.9
7.	A/grey heron/Tyva/33/2016	H5N8	7,9 ± 0.4	н/д	н/д	1.1/0.7
8.	A/garganey/Altai/2092/2016	H5N8	8.0 ± 0.6	2.0 ± 0.4	2.9 ± 0.6	0,75/0,75
9.	A/gadwall/Kurgan/2442/2016	H5N8	7.6 ± 0.4	2.1 ± 0.4	3.0 ± 0.5	0,55/0,53
10.	A/mallard/Toguchin/1154/2016	H6N1	8.6 ± 0.4	>5.0	>5.0	0,69/0,53
11.	A/teal/Toguchin/1157/2016	H6N1	8.4 ± 0.4	>5.0	>5.0	1,14/0,62
12.	A/teal/Toguchin/1156/2016	H6N1	8.5 ± 0.3	>5.0	>5.0	1,9/0,11
13.	A/teal/Toguchin/1153/2016	H6N1	9.1 ± 0.5	>5.0	>5.0	1,85/0,11
14.	A/wild duck/Tatarstan/3059/2016	H5N8	8.6 ± 0.4	2.0 ± 0.3	2.9 ± 0.4	0.58/0.29
15.	A/environment/Kamchatka/117/2016	H13N8	7.3 ± 0.5	5.2 ± 0.2	>5.0	0,82/0,7
16.	A/environment/Kamchatka/18/2016	H5N5	9.0 ± 0.5	2.8 ± 0.4	4.4 ± 0.5	2,39/0,81
17.	A/chicken/Kalmykia/2634/2016	H5N8	8.6 ± 0.4	н/д	н/д	0.73/0.51
18.	A/chicken/Kalmykia/2643/2016	H5N8	7.6 ± 0.4	2.0 ± 0.4	2.9 ± 0.6	0.60/0.28
19.	A/chicken/Kalmykia/2655/2016	H5N8	8.2 ± 0.4	н/д	н/д	0.81/0.32
20.	A/chicken/Kalmykia/2661/2016	H5N8	7.4 ± 0.4	н/д	н/д	0.58/0.29
21.	A/chicken/Kalmykia/2667/2016	H5N8	8.4 ± 0.5	н/д	н/д	0.47/0.21
22.	A/chicken/Astrakhan/3109/2016	H5N8	8,4 ± 0.5	1.9 ± 0.4	2.4 ± 0.5	0.59/0.28
23.	A/chicken/Astrakhan/3111/2016	H5N8	7.6 ± 0.4	н/д	н/д	0,49/0,41
24.	A/chicken/Astrakhan/3116/2016	H5N8	8,9 ± 0.4	н/д	н/д	0.51/0.26
25.	A/chicken/Astrakhan/3126/2016	H5N8	8,2 ± 0.4	н/д	н/д	0.91/0.47
26.	A/chicken/Astrakhan/3131/2016	H5N8	8,0± 0.5	1.9 ± 0.6	2.7 ± 0.4	0.76/0.66

Примечание: \* - M – среднее значения показателя, Sm – стандартное отклонение.  
ЭИД<sub>50</sub> – 50 % эмбриональная инфицирующая доза; ИД<sub>50</sub> - 50 % инфицирующая доза для мышей линии Balb/c; ЛД<sub>50</sub> – 50 % летальная доза для мышей линии Balb/c; IC<sub>50</sub> – 50% ингибирующая концентрация, н/д – исследования не проводились.

При титровании на РКЭ изученные штаммы подтипа H5N8 показали высокую степень репродукции. Титр вируса в аллантоисной жидкости находился в диапазоне от 7.4 до 9.3 lgЭИД<sub>50</sub>/мл. Также высокую инфекционность для РКЭ показали и другие выделенные в 2016 году штаммы. Несмотря на различия в титрах между штаммами H5N8 2016 года, все они оказались более инфекционными для РКЭ, чем штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 H5N8, выделенный в 2014 году в России. Для всех штаммов было определено

наличие аминокислотной последовательности REKRRKR\*GL в сайте протеолитического расщепления гемагглютинаина, что характерно для высокопатогенных штаммов вируса гриппа.

Также, изученные штаммы показали высокую степень вирулентности для мышей. При интраназальном заражении мышей Balb/c показатель инфекционной дозы (ИД50) находился в диапазоне 1,7 – 2,1 lgЭИД50. Также, для штаммов были определены значения летальной дозы (ЛД50), которые составили 2,2 – 3,0 lgЭИД50. Показатели вирулентности для изученных штаммов также были выше, чем у штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 H5N8 и оказались сопоставимы с показателями у штаммов H5N1, циркулировавших в России в 2015 году. Все изученные штаммы были чувствительны к действию противовирусных препаратов – ингибиторов нейраминидазы озельтамивиру и занамивиру, что было продемонстрировано флюоресцентным методом измерения ингибирования нейраминидазы.

Результаты исследования антигенных свойств выделенных вирусов подтипа H5N8 показали, что изучаемые штаммы не имеют сродства со штаммами H5N1 клады 2.3.2.1с, выделенными в России в 2015 году, но имеют высокую степень родства со штаммом клады 2.3.4.4 A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8), а также с референс штаммом той же клады A/Nothorn Pintail/WA/40964/2014 (H5N2) и штаммом A/Sichuan/26221/2014-RG42A (H5N6), выделенным от человека (табл. 18).

Полученные данные согласуются с проведенным филогенетическим анализом, который также подтвердил, что изучаемые штаммы подтипа H5N8 относятся к генетической кладе 2.3.4.4. Однако, штаммы вируса гриппа H5N8, выделенные в 2016 году, находятся в другой генетической группе В. Штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 и референс штамм A/Sichuan/26221/2014-RG42A формируют группу А, представители которой циркулировали до 2016 года (рис.1). Анализ нуклеотидных последовательностей генома выделенных штаммов выявил ряд генотипических отличий от референс штамма клады 2.3.4.4, которые были выявлены при помощи H5N1 Genetic Changes Inventory

(<http://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1/inventory.htm>) и с использованием сервиса FluSurver (<http://flusurver.bii.a-star.edu.sg>).

Таблица 18. Результаты РТГА со штаммами вируса гриппа H5-подтипа

Штамм	Подтип	Клада	Сыворотка						
			A/rook/Chany/32/2015	A/duck/England/36254/2014	A/Nothorn Pintail/WA/40964/2014	A/Sichuan/26221/2014-RG42A	A/gyrfalcon/WA/41088/2014-RG43A	A/great crested grebe/Tyva/34/2016	A/wigeon/Sakha/1/2014
			2.3.2.1c	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4
Референс антигены		Обратные титры антител							
A/rook/Chany/32/2015	H5N1	2.3.2.1c	320	<20	160	<20	<20	640	<20
A/duck/England/36254/2014	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	1280
A/Nothorn Pintail/WA/40964/2014	H5N2	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640
A/Sichuan/26221/2014 RG42A	H5N6	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	320
A/gyrfalcon/WA/41088/2014 RG43A	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	1280	1280	1280
A/great crested grebe/Tyva/34/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	320
A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	2560	5120	640	1280	1280
Тестируемые антигены									
A/black-headed gull/Tyva/41/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	2560	5120	320	640	640
A/grey heron/Tyva/20/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	640	640	320
A/grey heron/Tyva/33/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	2560	5120	640	640	640
A/great crested grebe/Tyva/35/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	320	5120	5120	640	320	320
A/garganey/Altai/2092/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	640	640	640
A/gadwall/Kurgan/2442/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	2560	1280	640	1280	320
A/wild duck/Tatarstan/3059/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640
A/environment/Kamchatka/18/2016	H5N5	2.3.4.4	<20	640	2560	2560	640	640	320
A/chicken/Kalmykia/2643/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	320	2560	1280	320	320	160
A/chicken/Astrakhan/3131/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640

У изученных штаммов был выявлен ряд мутаций, отвечающих за вирулентность и изменение хозяйской специфичности (табл. 19). Так, при анализе аминокислотной последовательности HA были выявлены две замены N110S и T139P. Подобные замены по литературным данным отвечают за усиление рецепторного взаимодействия с  $\alpha$ 2-6 остатками сиаловых кислот. В гене NS1 были выявлены две мутации V226I и E227G, которые отвечают за вирулентность и, в частности, за ее усиление, которое было показано экспериментально в сравнении со штаммом 2014 года A/wigeon/Sakha/1/2014 (табл. 17). Также в белке M2 была выявлена мутация I51V, которая, по

литературным данным, совместно с мутацией S31N, вероятно, может указывать на устойчивость штаммов к антивирусным препаратам адамантанового ряда, однако мутация S31N у исследуемых штаммов выявлена не была. Таким образом, можно предположить, что выделенные штаммы являются чувствительными к препаратам адамантанового ряда. Помимо всего прочего, у выделенных штаммов в белке PB2 была выявлена мутация I292V. Ранее было показано, что мутации в позиции 292 могут влиять на адаптацию вирусов к передаче от человека к человеку.

Таблица 19. Аминокислотные различия в гене HA между выделенными штаммами и кандидатным вакцинным штаммом клады 2.3.4.4 A/Sichuan/26221/2014(H5N6)

Штамм	а.к. замена в гене HA											
	3	16	38	110	139	185	194	201	285	298	492	547
A/Sichuan/26221/2014(H5N6)	K	G	K	N	T	Q	V	A	M	I	K	I
A/black-headed gull/Tyva/41/2016	N	S		S	P	R	I	E	V	V	E	M
A/great crested grebe/Tyva/34/2016	N	S		S	P	R	I	E	V	V	E	M
A/wild duck/Tyva/35/2016	N	S		S	P	R	I	E	V	V	E	M
A/gadwall/Kurgan/2442/2016	N	S		S	P	R	I	E	V	V	E	M
A/wild duck/Tatarstan/3059/2016	N	S		S	P	R	I	E	V	V	E	M
A/environment/Kamchatka/18/2016	N	S		S	P	L	I	E	V	V		M
A/chicken/Kalmykia/2661/2016	N	S		S	P	R	I	E	V	V	E	M
A/chicken/Astrakhan/3131/2016	N	S		S	P	R	I	E	V	V	E	M
A/chicken/Kalmykia/2643/2016	N	S		S	P	R	I	E	V	V	E	M

Таким образом, в ходе мониторинга ВГП в 2016 году было отмечено дальнейшее расширение географии сбора биологического материала. Сбор проб был осуществлен на территории 32 регионов России. Это, в частности, способствовало выявлению различных вариантов вируса гриппа среди диких птиц (A(H13N8), A(H6N1), A(H5N5)). При этом стоит особо отметить, что весной 2016 года удалось зафиксировать занос высокопатогенного вируса гриппа подтипа H5N8 на территорию республики Тыва из стран Юго-Восточной Азии. Впоследствии данный вариант вируса распространился по территории страны и вызвал вспышки в Европейской части России, которые стали началом масштабной эпизоотии. В очередной раз была подтверждена эффективность системы мониторинга при раннем выявлении ВГП, имеющих важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение. Помимо этого, была подчеркнута важность комплексного мониторинга. Так, исследования

сывороток крови людей, контактировавших с птицей во время вспышек, позволили выявить наличие антител к вирусам гриппа (раздел 3.7) и оценить риск распространения вируса гриппа подтипа H5N8 среди людей.

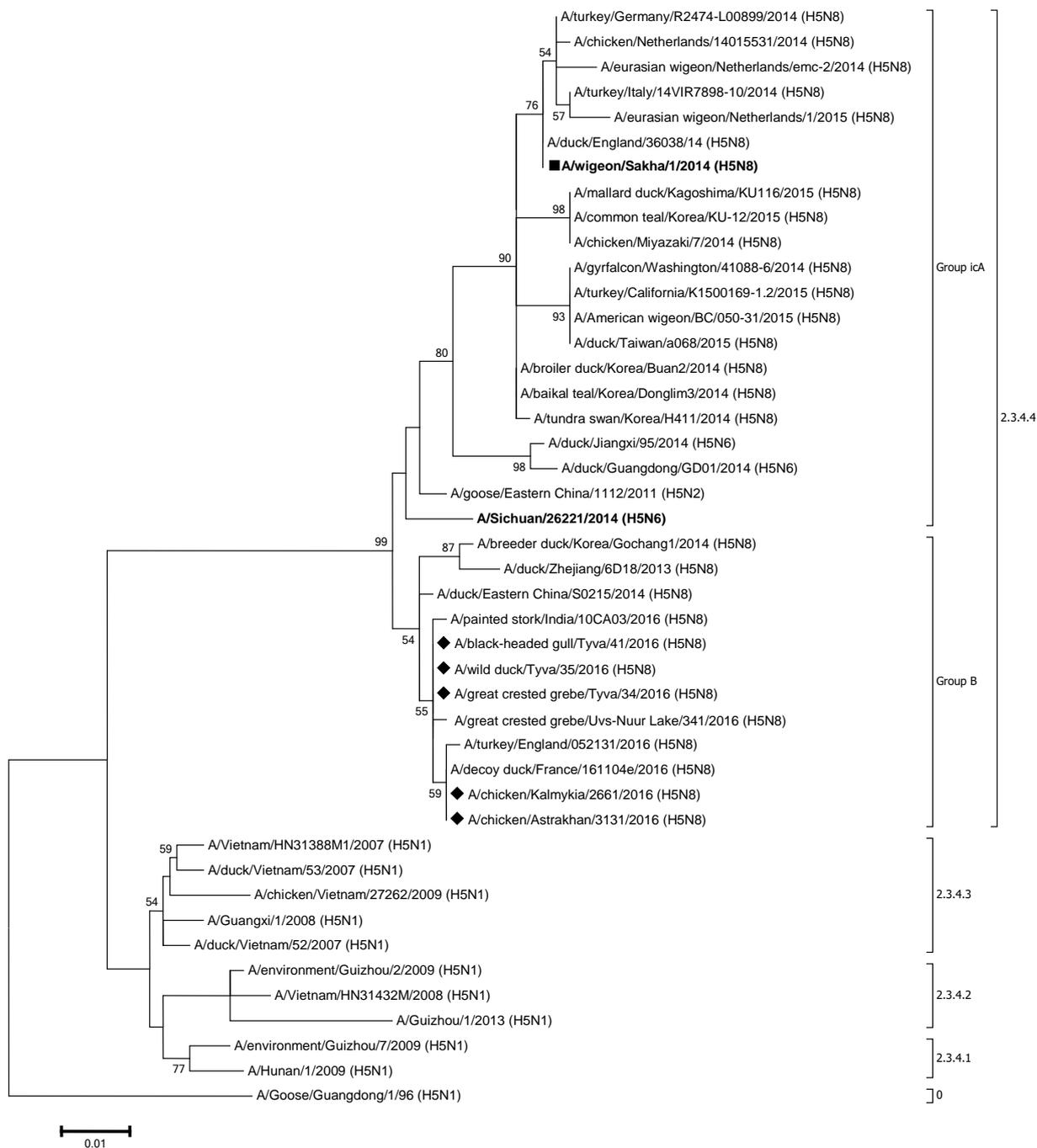


Рисунок 16. Филогенетическое дерево гена HA вирусов гриппа H5Nx подтипа. Штаммы, выделенные в 2016 г. отмечены ромбами. Штамм, выделенный в 2014 году отмечен квадратом. Кандидатный вакцинный штамм выделены жирным шрифтом.

### **3.5 Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2017 году**

В 2017 году совместно с региональными лабораториями Роспотребнадзора было собрано 8785 образцов от птиц, свиней и людей, по роду своей деятельности контактирующих с дикой или домашней птицей, для исследования на наличие РНК вируса гриппа А (табл. 20). Сбор биоматериала от морских млекопитающих в 2017 году не осуществлялся. Из общего числа обследованных совместно с региональными лабораториями образцов в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора было исследовано 1689 проб биоматериала от 924 диких и домашних птиц и 4 свиней из девятнадцати региональных ФБУЗ ЦГиЭ. Всего за 2017 год мониторинг вируса гриппа был осуществлен на территории 36 региональных ФБУЗ ЦГиЭ.

В результате исследований биоматериала было выделено 56 вирусов гриппа А. Из общего числа 2 вируса, выделенные от диких птиц на территории Новосибирской области, относились к подтипу H4N6, один вирус, выделенный на территории Хабаровского края, принадлежал к подтипу H10N6. Также, было выделено три штамма вируса гриппа подтипа H3N2 из биоматериала, взятого от свиней на территории Иркутской области.

Пятьдесят штаммов было представлено высокопатогенными вирусами гриппа А, в основном, подтипа H5N8, которые были выделены во время масштабной эпизоотии в Европейской части России. С декабря 2016 до апреля 2017 вспышки регистрировались среди диких и домашних птиц в Краснодарском крае и Ростовской области. Следует особо отметить гибель птиц из коллекции зоопарка города Воронежа, которая была отмечена в январе 2017 года. В марте 2017 года вспышки среди диких и домашних птиц были зафиксированы в нескольких районах Московской и Калининградской областей. В мае 2017 года гибель домашних птиц, вызванная вирусом гриппа А/H5N8, была повторно зарегистрирована в Ростовской области, а также в республиках Татарстан и Марий-Эл и в Пермском крае. В летний период 2017 года вспышек гриппа птиц выявлено не было, однако в октябре и в ноябре 2017

года вирус гриппа А/Н5N8 снова вызвал гибель домашних кур на частных подворьях Ростовской области. В это же время было выделено 5 изолятов высокопатогенного вируса гриппа А/Н5N2 от павших птиц во время вспышки в Костромской области.

В 2017 году были изучены и сравнены биологические характеристики некоторых штаммов вируса гриппа А/Н5Nх, выделенных в 2017 году, а также ранее выделенных штаммов. Анализ штаммов вируса гриппа свиней, которые также имеют важное эпидемиологическое значение, будет представлен в разделе 3.6.

При культивировании в 9-дневных развивающихся куриных эмбрионах все изученные вирусы подтипа Н5 показали высокую степень вирулентности для куриных эмбрионов, приводя к их гибели в течение 48 часов после заражения. Инфекционный титр вируса в аллантоисной жидкости составил от 7,2 до 9,2 lg ЭИД50/мл (табл. 21). Показатели инфекционности вновь выделенных штаммов оказались сопоставимы с показателями штамма А/great crested grebe/Tyva/34/2016 (Н5N8), выделенного в мае 2016 года до начала масштабной эпизоотии в России, и были выше показателей инфекционности штаммов А/environment/Kamchatka/18/2016 (Н5N5) и А/wigeon/Sakha/1/2014 (Н5N8), циркулировавших ранее.

Для всех штаммов было определено наличие аминокислотной последовательности REKRRKR\*GL в сайте протеолитического расщепления гемагглютиниона, что характерно для высокопатогенных штаммов вируса гриппа. Также, изученные штаммы показали высокую степень вирулентности для мышей. При интраназальном заражении мышей Valb/c показатель инфекционной дозы (ИД50) находился в диапазоне 1,54 – 2,4 lg ЭИД50. Также, для штаммов были определены значения летальной дозы (ЛД50), которые составили 1,83 – 3,1 lg ЭИД50.

Таблица 20. Результаты мониторинга вируса гриппа А за 2017г.

№№	Место сбора проб	Исследовано образцов										Выделено вирусов гриппа
		от диких птиц		от домашних птиц		От свиней		От морских млекопитающих		От людей		
		Весна	Осень	Весна	Осень	Весна	Осень	Весна	Осень	Весна	Осень	
1	Алтайский край		14		23							
2	Забайкальский край	2	10									
3	Иркутская область	99	240	75	150		4			100	200	3 (H3N2) <sup>×</sup>
4	Камчатский край	50	145	50						100		
5	Кемеровская область	108		150		20				150		
6	Красноярский край	32	110	105	210						100	
7	Курганская область	30		50	50					50	49	
8	Магаданская область	36	4		40							
9	Новосибирская область	128	190			2						2 (H4N6) <sup>*</sup>
10	Омская область	50		50		50						
11	Оренбургская область	270	330	100	100					100	100	
12	Пермский край	8	37	36	8					20	18	3 (H5N8) <sup>#</sup>
13	Приморский край	345		368	458	30	50			131	145	
14	Республика Алтай	30		25		10						
15	Республика Бурятия	77		50		10				75		
16	Республика Коми	10										
17	Республика Саха (Якутия)											
18	Республика Татарстан	7		20						28		2 (H5N8) <sup>#</sup>
19	Республика Тыва	4								35		
20	Саратовская область		67								60	
21	Сахалинская область		200									
22	Свердловская область		25								5	
23	Ставропольский край	108	108	120	120					50	100	
24	Томская область	20	20	75	75	15	15			75	75	
25	Тюменская область			100	100					100	200	
26	Хабаровский край	64										1 (H10N6) <sup>*</sup>
27	Ямало-Ненецкий АО	69	285	65	77					75	76	

28	Волгоградская область										100		
29	Республика Марий Эл			6								2 (H5N8) #	
30	Ростовская область	22			6							13 (H5N8) #	
31	Воронежская область	11										11 (H5N8)* #	
32	Краснодарский край	4										4 (H5N8)* #	
33	Калининградская область	4										3 (H5N8)*	
34	Московская область	14										7 (H5N8) #	
35	Тульская область	3											
36	Костромская область				10							5 (H5N2) #	
	<b>ИТОГО: 8785</b>	<b>1605</b>	<b>1785</b>	<b>1445</b>	<b>1427</b>	<b>137</b>	<b>69</b>				<b>1089</b>	<b>1228</b>	<b>56</b>
Примечание: * - вирус выделен из образцов от диких птиц; # - вирус выделен из образцов от домашних птиц; x - вирус выделен из образцов от свиней													

Таблица 21. Биологические свойства выделенных штаммов вируса гриппа А

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занамивира/озельтамивира
			РКЭ	Мыши линии Balb/c		IC50, нМ
			IgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	ИД <sub>50</sub> , IgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	ЛД <sub>50</sub> , IgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	
<b>Ранее выделенные штаммы</b>						
1	A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	6.2 ± 0.5	2.9 ± 0.4	4.1 ± 0.4	1.00/0.33
2	A/rook/Chany/32/2015	H5N1	8.7 ± 0.4	1.9 ± 0.4	2.9 ± 0.8	0.35/0.55
3	A/great crested grebe/Тыва/34/2016	H5N8	9.3 ± 0.3	1.7 ± 0.5	2.3 ± 0.5	1.0/0.7
4	A/environment/Камчатка/18/2016	H5N5	9.0 ± 0.5	2.8 ± 0.4	4.4 ± 0.5	2,39/0,81
<b>Исследуемые штаммы</b>						
1.	A/goose/Krasnodar/3144/2017	H5N8	8,2 ± 0.4	2.3 ± 0.4	2.9 ± 0.5	0.98/0.57
2.	A/goose/Krasnodar/3148/2017	H5N8	8,2 ± 0.4	н/д	н/д	0.73/0.51
3.	A/mute swan/Krasnodar/25/2017	H5N8	9,0 ± 0.5	н/д	н/д	0.91/0.47
4.	A/mute swan/Krasnodar/26/2017	H5N8	8.6 ± 0.4	1.9 ± 0.4	2.7 ± 0.6	3.12/0.52
5.	A/turkey/Rostov/2/2017	H5N8	8.2 ± 0.4	н/д	н/д	0,48/0,42
6.	A/turkey/Rostov/4/2017	H5N8	8.2 ± 0.6	н/д	н/д	0,54/0,48
7.	A/turkey/Rostov/7/2017	H5N8	8.4 ± 0.6	н/д	н/д	0,91/0,80
8.	A/turkey/Rostov/10/2017	H5N8	8.7 ± 0.4	2.2 ± 0.4	2.9 ± 0.5	0,91/0,62
9.	A/turkey/Rostov/11/2017	H5N8	8.0 ± 0.5	н/д	н/д	0,91/0,68
10.	A/northern goshawk/Voronezh/13/2017	H5N8	8.2 ± 0.6	н/д	н/д	0,84/0,72
11.	A/ural owl/Voronezh/14/2017	H5N8	8,6 ± 0.4	н/д	н/д	0,99/0,69
12.	A/long-eared owl/Voronezh/15/2017	H5N8	8,0 ± 0.5	2.2 ± 0.5	2.9 ± 0.6	0.76/0.66
13.	A/long-eared owl/Voronezh/16/2017	H5N8	8.6 ± 0.4	н/д	н/д	0,69/0,51
14.	A/chicken/Voronezh/17/2017	H5N8	8.5 ± 0.3	н/д	н/д	0,58/0,57
15.	A/chicken/Voronezh/18/2017	H5N8	7.8 ± 0.6	н/д	н/д	0,81/0,71
16.	A/chicken/Voronezh/19/2017	H5N8	8,2 ± 0.4	н/д	н/д	0,59/0,46
17.	A/chicken/Voronezh/20/2017	H5N8	9,0 ± 0.5	н/д	н/д	0,60/0,55
18.	A/chicken/Voronezh/21/2017	H5N8	7.9 ± 0.6	н/д	н/д	1,00/0,80
19.	A/chicken/Voronezh/22/2017	H5N8	8.3 ± 0.6	н/д	н/д	1,20/0,77
20.	A/mute swan/Voronezh/23/2017	H5N8	8.2 ± 0.6	н/д	н/д	0,62/0,40
21.	A/mute swan/Kaliningrad/130/2017	H5N8	7.2 ± 0.3	н/д	н/д	0,6/0,77
22.	A/mute swan/Kaliningrad/131/2017	H5N8	8.6 ± 0.7	2.2 ± 0.5	2.8 ± 0.4	0,79/0,84
23.	A/mute swan/Kaliningrad/132/2017	H5N8	7.8 ± 0.3	н/д	н/д	0,69/0,6
24.	A/chicken/Shchyolkovo/46/2017	H5N8	8.6 ± 0.4	н/д	н/д	0,64/0,89
25.	A/chicken/Shchyolkovo/47/2017	H5N8	8.8 ± 0.3	1.9 ± 0.4	3.1 ± 0.5	0,75/0,65
26.	A/chicken/Shchyolkovo/48/2017	H5N8	7.8 ± 0.6	н/д	н/д	0,76/0,73
27.	A/chicken/Shchyolkovo/49/2017	H5N8	8.2 ± 0.6	н/д	н/д	0,87/0,6
28.	A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017	H5N8	9.2 ± 0.6	1.9 ± 0.4	2.9 ± 0.6	0,49/0,41
29.	A/chicken/Sergiyev Posad/39/2017	H5N8	7.6 ± 0.6	н/д	н/д	0,73/0,5
30.	A/chicken/Sergiyev Posad/42/2017	H5N8	8.6 ± 0.4	н/д	н/д	0,67/0,57
31.	A/chicken/Rostov/44/2017	H5N8	8.8 ± 0.3	н/д	н/д	0,67/0,63
32.	A/chicken/Rostov/45/2017	H5N8	8.4 ± 0.6	н/д	н/д	0,65/0,58
33.	A/chicken/Tatarstan/88/2017	H5N8	8.7 ± 0.4	2.0 ± 0.4	2.4 ± 0.4	0,75/0,75
34.	A/chicken/Tatarstan/112/2017	H5N8	7.9 ± 0.6	2.3 ± 0.4	2.7 ± 0.6	1,66/35,33
35.	A/turkey/Perm/7887/2017	H5N8	7.5 ± 0.5	2.2 ± 0.4	2.8 ± 0.4	0,36/0,42
36.	A/turkey/Perm/7909/2017	H5N8	8.3 ± 0.6	н/д	н/д	0,37/0,37
37.	A/turkey/Perm/7910/2017	H5N8	7.5 ± 0.7	н/д	н/д	1/0,7
38.	A/chicken/Mari El/236/2017	H5N8	8.7 ± 0.4	2.2 ± 0.5	2.7 ± 0.4	1/0,83
39.	A/chicken/Mari El/335/2017	H5N8	8.2 ± 0.6	н/д	н/д	1,04/0,56
40.	A/chicken/Rostov-on-Don/1321/2017	H5N8	8.6 ± 0.4	2.2 ± 0.5	2.8 ± 0.4	0,69/0,53

41.	A/chicken/Rostov-on-Don/1322/2017	H5N8	8.4 ± 0.4	н/д	н/д	1,14/0,62
42.	A/chicken/Rostov-on-Don/1323/2017	H5N8	8.2 ± 0.5	н/д	н/д	0,73/0,29
43.	A/chicken/Rostov-on-Don/1324/2017	H5N8	8.4 ± 0.5	н/д	н/д	0,9/0,38
44.	A/chicken/Rostov-on-Don/1598/2017	H5N8	8.2 ± 0.3	2.4 ± 0.4	3.0 ± 0.6	0,67/0,45
45.	A/chicken/Rostov-on-Don/1599/2017	H5N8	8.2 ± 0.4	н/д	н/д	0,77/0,47
46.	A/chicken/Kostroma/1717/2017	H5N2	8.5 ± 0.3	н/д	н/д	1,9/0,11
47.	A/chicken/Kostroma/1718/2017	H5N2	8.9 ± 0.4	1.54 ± 0.6	1.83 ± 0.6	1,69/0,12
48.	A/chicken/Kostroma/1719/2017	H5N2	9.1 ± 0.5	н/д	н/д	1,85/0,11
49.	A/chicken/Kostroma/1720/2017	H5N2	9.1 ± 0.5	н/д	н/д	1,45/0,12
50.	A/chicken/Kostroma/1721/2017	H5N2	8.5 ± 0.4	н/д	н/д	1,66/0,08
51.	A/swine/Irkutsk/155/2017	H3N2	7.2 ± 0.3	>5,0	>5,0	2.23/0.13
52.	A/swine/Irkutsk/158/2017	H3N2	6.8 ± 0.4	>5,0	>5,0	2.90/0.18
53.	A/swine/Irkutsk/182/2017	H3N2	7.0 ± 0.3	>5,0	>5,0	2.29/0.15
54.	A/mallard/Khabarovsk/241/2017	H10N6	8,1±0,5	>5,0	>5,0	0,63/0,15
55.	A/mallard/Toguchin/19/2017	H4N6	7,8±0,4	>5,0	>5,0	0,95/0,27
56.	A/mallard/Toguchin/13/2017	H4N6	7,3±0,5	>5,0	>5,0	0.48/0.33

Примечание: \* - M – среднее значения показателя, Sm – стандартное отклонение.  
ЭИД50 – 50 % эмбриональная инфицирующая доза; ИД50 - 50 % инфицирующая доза для мышей линии Balb/c; ЛД50 – 50 % летальная доза для мышей линии Balb/c; IC50 – 50% ингибирующая концентрация, н/д – исследования не проводились.

При этом, показатели вирулентности для изученных штаммов различались в зависимости от подтипа выделенного вируса. Так, показатели инфекционности штамма A/environment/Kamchatka/18/2016 (H5N5), выделенного в 2016 году, были сопоставимы с показателями инфекционности штаммов H5N8, выделенных в 2017 году, однако данный штамм оказался менее летальным для мышей, чем вновь выделенные вирусы H5Nx. При этом, по результатам исследования можно предположить, что штамм A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2) обладает наибольшей вирулентностью для мышей.

Также, высокая вирулентность штамма A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2) была дополнительно подтверждена при заражении хорьков. При интраназальном заражении хорьков штаммом A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2) показано, что вирус накапливается в невысоких концентрациях (3,8 lg ЭИД50/мл) на слизистой носовой полости, при этом вызывает заболевание животного с повышением температуры тела до 41,5 °С (в норме температура составляет 37,5-39°С) с последующей гибелью животного на 9-е сутки после

заражения. При этом контактный хорек, который находился в потоке воздуха от заболевшего хорька в течение всего периода наблюдения (8 сут) не был инфицирован – вирус не обнаружен, температура тела не повысилась (табл. 22).

Таблица 22. Накопление вируса гриппа A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2) на слизистой носовой полости у хорьков и температура тела после интраназального инфицирования и после контакта с инфицированным хорьком

№ Жив.	Доза, lg ЭИД50	Концентрация вируса в носовом смыве у хорьков, lg ЭИД/мл								
		До заражения	1 сут п.з.	2 сут п.з.	3 сут п.з.	4 сут п.з.	6 сут п.з.	7 сут п.з.	8 сут п.з.	9 сут п.з.
1	3,0		1,0	2,47	2,84	3,17	3,47	3,77	3,77	погиб
2 (контакт)	0		≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	
Температура тела хорьков, t °C										
1	3,0	39,1	39	40,3	40,7	41,1	41,5	41,5	41,2	погиб
2 (контакт)	0	38,5	38,4	38,2	37,9	38,6	37,8	38,2	37,7	37,6

Таким образом, вирус гриппа птиц A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2) вызывает летальное заболевание мышей и хорьков при интраназальном заражении, но, по-видимому, не передается воздушно-капельным путем от больных животных здоровым. Данный результат, конечно, нельзя считать достоверным ввиду того, что выборка животных не была репрезентативной, тем не менее, предварительные данные также имеют важное значение при оценке пандемического потенциала штамма A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2).

Антигенные свойства выделенных штаммов дополнительно были исследованы в реакции торможения гемагглютинации с использованием референс антигенов и сывороток крови хорьков, полученных на референс антигены, а также на антигены ранее выделенных в России штаммов вируса гриппа H5 (табл. 23). Результаты показали, что все изученные штаммы H5Nx, включая штамм A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2), имеют высокую степень антигенного родства со штаммами вируса гриппа H5N8, циркулировавшими ранее в России, а также рекомендованными в 2016-2017 кандидатными вакцинными штаммами клады 2.3.4.4.

Таблица 23. Результаты РТГА со штаммами вируса гриппа H5-подтипа

Штамм	Подтип	Клада	Сыворотка							
			A/rook/Chany/32/2015	A/duck/England/36254/2014	A/Nothern Pintail/WA/40964/2014	A/Sichuan/26221/2014-RG42A	A/gyrfalcon/WA/41088/2014-RG43A	A/great crested grebe/Tyva/34/2016	A/wigeon/Sakha/1/2014	A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017
			2.3.2.1c	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4
<b>Референс антигены</b>			<b>Обратные титры антител</b>							
A/rook/Chany/32/2015	H5N1	2.3.2.1c	320	<20	160	<20	<20	640	<20	<20
A/duck/England/36254/2014	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	1280	1280
A/Nothern Pintail/WA/40964/2014	H5N2	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	640
A/Sichuan/26221/2014 RG42A	H5N6	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	320	320
A/gyrfalcon/WA/41088/2014 RG43A	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	1280	1280	1280	1280
A/great crested grebe/Tyva/34/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	320	320
A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	2560	5120	640	1280	1280	640
A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	640
<b>Исследуемые антигены</b>										
A/goose/Krasnodar/3144/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640	640
A/goose/Krasnodar/3148/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640	640
A/mute swan/Krasnodar/25/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	320
A/mute swan/Krasnodar/26/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	320
A/turkey/Rostov/2/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640	320
A/turkey/Rostov/4/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640	320
A/turkey/Rostov/10/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	640	640	640
A/turkey/Rostov/11/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	320
A/northern goshawk/Voronezh/13/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640	640
A/ural owl/Voronezh/14/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640	640
A/long-eared owl/Voronezh/15/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	320	5120	5120	320	640	640	640
A/chicken/Voronezh/20/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640	640
A/mute swan/Kaliningrad/130/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	2560	640	640	320	640
A/mute swan/Kaliningrad/131/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640	640
A/mute swan/Kaliningrad/132/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	640	640	640	640
A/chicken/Shchyolkovo/46/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	320
A/chicken/Shchyolkovo/47/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	320
A/chicken/Shchyolkovo/48/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	320
A/chicken/Shchyolkovo/49/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	320
A/chicken/Sergiyev Posad/39/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	640
A/chicken/Sergiyev Posad/42/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	640
A/chicken/Rostov/44/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	1280	640	320
A/chicken/Rostov/45/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640	320
A/chicken/Tatarstan/88/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	320	640	640	320
A/chicken/Tatarstan/112/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	320	640	640	320
A/turkey/Perm/7887/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	640	1280	640	320
A/turkey/Perm/7909/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	640	1280	640	640
A/turkey/Perm/7910/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	640	1280	640	320

A/chicken/Mari El/236/2017	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	5120	5120	640	1280	640	640
A/chicken/Mari El/335/2017	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	5120	5120	640	1280	640	640
A/chicken/Rostov-on-Don/1321/2017	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	640
A/chicken/Rostov-on-Don/1322/2017	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	5120	5120	320	640	640	320
A/chicken/Rostov-on-Don/1323/2017	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	5120	5120	640	1280	640	320
A/chicken/Rostov-on-Don/1324/2017	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	1280	5120	5120	320	640	640	320
A/chicken/Rostov-on-Don/1598/2017	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	5120	5120	640	1280	640	640
A/chicken/Rostov-on-Don/1599/2017	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	2560	640	640	160	640
A/chicken/Kostroma/1717/2017	H5N2	<b>2.3.4.4</b>	<20	<20	640	10240	2560	640	640	160
A/chicken/Kostroma/1718/2017	H5N2	<b>2.3.4.4</b>	<20	<20	640	10240	2560	640	640	160
A/chicken/Kostroma/1719/2017	H5N2	<b>2.3.4.4</b>	<20	<20	640	10240	2560	640	640	160
A/chicken/Kostroma/1720/2017	H5N2	<b>2.3.4.4</b>	<20	<20	640	10240	2560	640	640	160
A/chicken/Kostroma/1721/2017	H5N2	<b>2.3.4.4</b>	<20	<20	640	10240	2560	640	640	160

Филогенетический анализ гена НА вновь выделенных в России штаммов H5Nx также определил их высокую степень идентичности и принадлежность к кладе 2.3.4.4 (рис. 17). Однако, в отличие от кандидатных вакцинных штаммов клады 2.3.4.4 сезона 2016-2017 гг., и штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8), выделенного ранее, все они относятся к группе В штаммов клады 2.3.4.4. Изученные штаммы показывают высокую степень идентичности с кандидатными вакцинными штаммами клады 2.3.4.4, предложенными ВОЗ в сезоне 2017-2018 гг.

При исследовании нуклеотидных последовательностей геномов выделенных штаммов с использованием Genetic Changes Inventory (<http://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1/inventory.htm>) и сервиса FluServer (<http://flusurver.bii.a-star.edu.sg>) был выявлен ряд мутаций – N46K в NA, N205S в белке NS1, A337T и K615R в белке PA, влияющих на антигенные свойства вирусов, вирулентность и хозяйскую специфичность вирусов гриппа (табл. 24, 25). В NA штамма A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2) была выявлена замена Y155H. Замены в данной позиции отвечают за устойчивость штаммов вируса гриппа к занамивиру и озельтамивиру, однако в результате исследования нейраминидазной активности при помощи флюоресцентного метода измерения ингибирования активности нейраминидазы, все исследованные штаммы, за исключением A/chicken/Tatarstan/112/2017 (H5N8), оказались чувствительными к противовирусным препаратам (табл. 21).

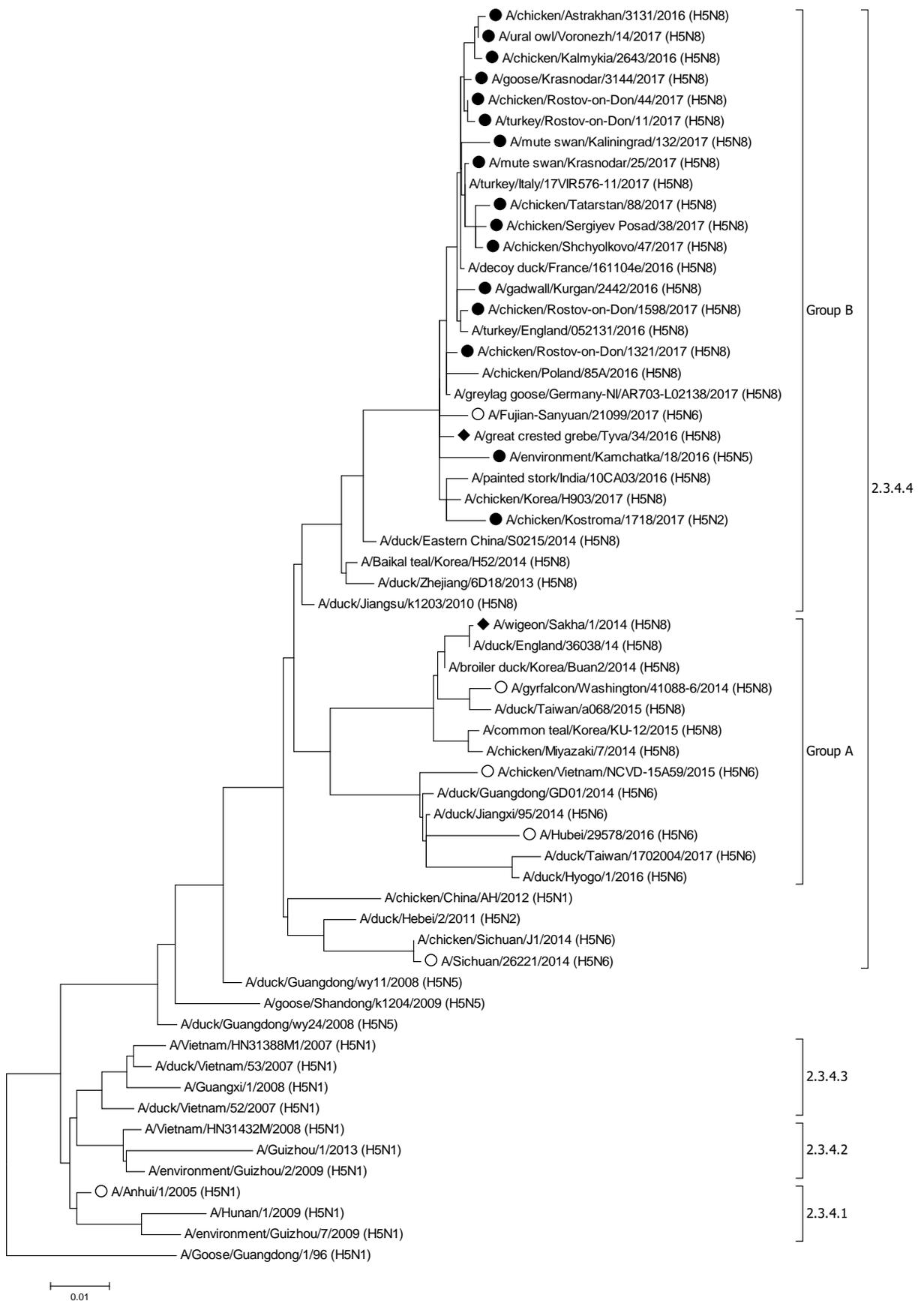


Рисунок 17. Филогенетическое дерево гена HA вирусов A(H5Nx). Штаммы, выделенные в России в 2016 году выделены черными кругами, ранее выделенный штамм A(H5N8) выделен черным ромбом. Кандидатные вакцинные штаммы клады 2.3.4.4 выделены белыми кругами.

Таблица 24. Аминокислотные различия в гене NA между выделенными штаммами и кандидатным вакцинным штаммом клады 2.3.4.4 A/Sichuan/26221/2014(H5N6)

Штамм	а.к. замена в гене NA													
	3	16	88	102	110	139	185	194	201	284	285	298	492	547
A/Sichuan/26221/2014(H5N6)	K	G	R	A	N	T	Q	V	A	E	M	I	K	I
A/mute swan/Krasnodar/25/2017	N	S	-	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/goose/Krasnodar/3144/2017	N	S	-	V	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/turkey/Rostov/11/2017	N	S	-	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/chicken/Voronezh/20/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/chicken/Voronezh/19/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/chicken/Voronezh/18/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/long-eared owl/Voronezh/16/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/Ural owl/Voronezh/14/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/long-eared owl/Voronezh/15/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/mute swan/Kaliningrad/132/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/chicken/Shchyolkovo/47/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/chicken/Rostov/44/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/chicken/Tatarstan/88/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/chicken/Sergiyev Posad/39/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M
A/chicken/Rostov-on-Don/1321/2017	N	S	S	-	S	P	R	I	E	G	V	V	E	M

Таблица 25. Аминокислотные различия в гене NA между выделенными штаммами и кандидатным вакцинным штаммом клады 2.3.4.4 A/Baikalteal/KoreaDonglim/3/2014(H5N8)

Штамм	а.к. замена в гене NA																					
	8	18	22	32	41	46	49	69	81	93	136	190	263	264	303	329	357	386	392	397	450	462
A/Baikalteal/KoreaDonglim/3/2014	V	V	V	T	N	N	V	S	T	K	S	A	G	R	I	T	V	E	V	S	Y	I
A/mute swan/Krasnodar/25/2017	A	-	-	M	-	K	I	-	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	-	-	L	H	-
A/goose/Krasnodar/3144/2017	A	-	-	M	-	K	I	-	A	R	A	T	D	Q	V	A	-	-	-	L	H	-
A/turkey/Rostov/11/2017	A	-	-	M	-	K	I	-	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	-	-	L	H	-
A/chicken/Voronezh/20/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	A	-	-	L	H	-
A/chicken/Voronezh/19/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	A	-	-	L	H	-
A/chicken/Voronezh/18/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	-	-	L	H	-
A/long-eared owl/Voronezh/16/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	-	-	L	H	-
A/Ural owl/Voronezh/14/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	K	-	L	H	-
A/long-eared owl/Voronezh/15/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	K	-	L	H	-
A/mute swan/Kaliningrad/132/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	-	-	L	H	-
A/chicken/Shchyolkovo/47/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	-	-	L	H	-
A/chicken/Rostov/44/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	-	-	L	H	-
A/chicken/Tatarstan/88/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	-	-	L	H	-
A/chicken/Sergiyev Posad/39/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	-	-	L	H	-
A/chicken/Rostov-on-Don/1321/2017	A	-	-	M	-	K	I	N	A	-	A	T	D	Q	V	A	-	-	-	L	H	-

Помимо этого, в NA штамма A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2) была выявлена делеция 20 аминокислот (рис. 18). Данная делеция сравнима с делецией в нейраминидазе высокопатогенных вирусов гриппа A/H5N1 и отсутствует в распространенном птичьем типе N2. Присутствие делеции в нейраминидазе A/chicken/Kostroma/1718/2017 может быть фактором, способствующим усилению патогенности вируса.

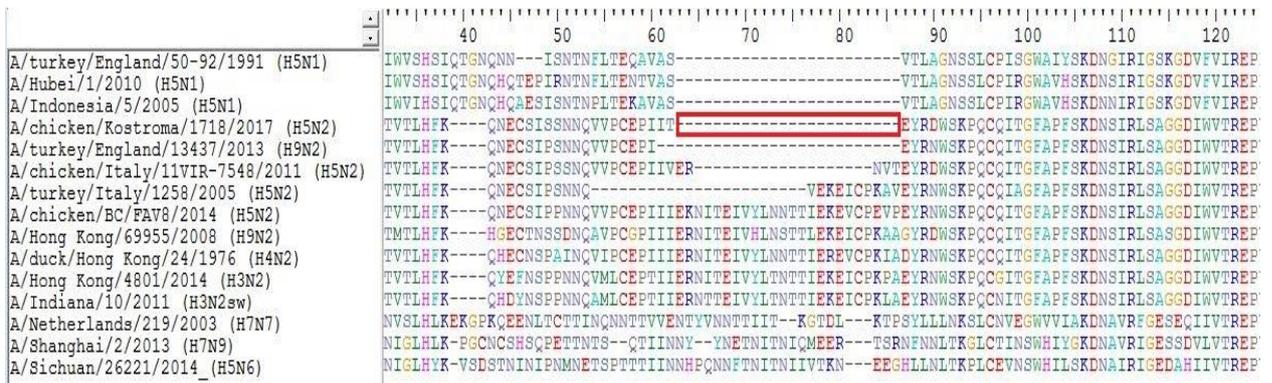


Рисунок 18. Геномные характеристики штамма A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2)

В 2017 году количество регионов Российской Федерации, в которых был проведен мониторинг ВГП составило 36, что говорит об очередном расширении географии сбора биологического материала. Вероятно, это было связано с тем, что в 2017 в рамках системы мониторинга ВГП была реализована и внедрена система Опорных баз, которая подразумевала сбор биологического материала на территории 48 регионов России. Также, было показано, что постоянный мониторинг ВГП в отдельно взятом регионе способствует выявлению циркуляции вирусов среди животных. Так, благодаря постоянному мониторингу на территории Иркутской области удалось выявить циркуляцию вируса гриппа подтипа H3N2, а на территории Новосибирской области в очередной раз были выделены низкопатогенные варианты ВГП (A(H4N6)). Помимо этого, надо сказать, что система мониторинга вируса гриппа в 2017 году позволила оперативно выявить и изучить этиологические агенты вспышек, зарегистрированных на территории России. Результаты показали, что в течение года вспышки были вызваны двумя разными подтипами НРАI вирусов – H5N8 и H5N2. При этом, изучение штамма A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2) показало наличие в геноме вируса определенных маркеров повышенной вирулентности. Также, система мониторинга позволила выявить циркуляцию вируса гриппа подтипа H5N8 среди диких птиц, что в определенной мере показало некоторые механизмы и пути распространения вируса по территории России в 2017 году. Таким

образом, совершенствование и оптимизация системы мониторинга показало свою эффективность в выявлении и изучении вируса гриппа птиц.

### **3.6 Мониторинг вируса гриппа на территории Российской Федерации в 2018 году**

В ходе мониторинга вируса гриппа птиц на территории Российской Федерации в 2018 году совместно с региональными лабораториями Роспотребнадзора было собрано и изучено на наличие РНК вируса гриппа А 8658 проб. Биоматериал был представлен образцами от диких и домашних птиц, мазками из носа от свиней, а также мазками от людей, по роду своей деятельности контактирующих с дикой или домашней птицей. Сбор биоматериала от морских млекопитающих в 2018 году не осуществлялся.

В 2018 году мониторинг вируса гриппа птиц осуществлялся на территории 43 регионов Российской Федерации. Основное количество проб биоматериала было собрано в весенний период 2018 года. При этом, наибольшее количество образцов было собрано на территориях Оренбургской области, Красноярского и Ставропольского краев. Наименьшее количество проб было собрано на территориях республик Марий Эл и Татарстан, Ростовской и Амурской областей. В некоторых регионах небольшое количество взятого материала объясняется тем, что сбор осуществлялся от павших птиц во время вспышек высокопатогенного гриппа и необходимости сбора большого количества образцов не было.

В России в 2018 году сохранилась неблагоприятная ситуация по высокопатогенному гриппу. Как и в предыдущие два года на территории России было зарегистрировано несколько вспышек среди птиц. Так, в мае 2018 года на территории Приморского края и Амурской области на нескольких птицефабриках была отмечена гибель сельскохозяйственной птицы. Из материала от погибших птиц был выделен вирус гриппа А/Н9N2. Затем, в сентябре и октябре 2018 года, вирус гриппа А/Н9N2 детектировался методом ПЦР в биоматериале от диких птиц на территории Томской области и

Хабаровского края соответственно, однако выделить вирус в этих случаях не удалось. В середине декабря гибель птицы была зарегистрирована на территории Приморского края. Из биоматериала от забитых кур также был выделен вирус гриппа А/Н9N2 (табл. 26).

В 2018 году был отмечен ряд вспышек среди сельскохозяйственных птиц на территории европейской части России, вызванных высокопатогенными вирусами гриппа Н5. В июне 2018 года гибель домашней птицы была отмечена на частных подворьях Курской, Пензенской, Самарской и Орловской областей. В июле также была зарегистрирована гибель птицы на частных подворьях Курской, Самарской, Орловской областей, Чувашской республики-Чувашии, а также на птицефабрике в Ростовской области. В августе гибель птицы на частных подворьях была зафиксирована на территории Чувашской республики-Чувашии, республик Татарстан и Марий Эл. В октябре 2018 года гибель птиц была зарегистрирована на птицефабрике в Ростовской области. Затем, в ноябре 2018 года падеж был зарегистрирован на территории птицефабрики в Воронежской области. В это же время на территории Саратовской области от дикой птицы был выделен вирус гриппа подтипа Н5N6.

Таблица 26 - Результаты сбора биологического материала от людей и животных в 2018г.

№ №	Регион сбора биоматериала	Исследовано образцов										Выделено вирусов гриппа
		Биопроб от дикой птицы		Биопроб от свиней		Биопроб от тюленей		Биопроб от домашней птицы		Биопроб от людей		
		весна	осень	весна	осень	весна	осень	весна	осень	весна	осень	
1.	Республика Алтай	35		12				28				
2.	Республика Бурятия	95		12								
3.	Республика Тыва	40										
4.	Республика Хакасия	12						33				
5.	Алтайский край	6		11								
6.	Красноярский край	80	210	28	25			85	210	9	150	
7.	Забайкальский край	23										
8.	Иркутская область	75		15				75		100		1 (H3N2) <sup>×</sup>
9.	Кемеровская область	25						110				
10.	Новосибирская область	107	212	10								4 (H3N6)*
11.	Омская область	55		55				132				
12.	Томская область	20	20	15	15			75	75	75	75	
13.	Ставропольский край	144	72	10	10			140	80	100	100	
14.	Астраханская область		10						100		100	
15.	Ростовская область							5	12			7 (H5N8) <sup>#</sup> , 1 (H5N6)*
16.	Хабаровский край	16	88		60							
17.	Камчатский край	110	75					40	50	114	100	
18.	Приморский край	60		20				141	239	72		3 (H9N2) <sup>#</sup>
19.	Амурская область			15								
20.	Магаданская область	132										
21.	Сахалинская область	50										
22.	Чукотский автономный округ		50									
23.	Курганская область		118		20				93		57	4 (H3N8)*
24.	Оренбургская область	276	324					100	100	100	100	
25.	Пермский край	6	24					72	16	50	10	
26.	Республика Башкортостан		23		20				10		21	
27.	Республика Коми	10						9				
28.	Республика Саха (Якутия)	233						300				
29.	Республика Татарстан		4									
30.	Самарская область			12				28		72		8 (H5N8) <sup>#</sup>
31.	Саратовская область	49						108				

32.	Свердловская область		30					10		5	
33.	Тюменская область						100	100	100	200	
34.	Ханты-Мансийский автономный округ	36	37				74		40		
35.	Челябинская область										
36.	Ямало-Ненецкий автономный округ	80	85		50		91	65	75	75	
37.	Курская область						76				5 (H5N8) <sup>#</sup>
38.	Пензенская область						21		46		4 (H5N8) <sup>#</sup>
39.	Орловская область						13		2		1 (H5N8) <sup>#</sup>
40.	Чувашской Республика – Чувашия						10		77		7 (H5N8) <sup>#</sup>
41.	Республика Марий Эл						1				1 (H5N8) <sup>#</sup>
42.	Костромская область							10			
43.	Воронежская область							26			4 (H5N8) <sup>#</sup>
<b>ИТОГО: 8658</b>		<b>1773</b>	<b>1382</b>	<b>215</b>	<b>200</b>		<b>2106</b>	<b>957</b>	<b>1032</b>	<b>993</b>	<b>50</b>
Примечание: * - вирус выделен из образцов от диких птиц; <sup>#</sup> - вирус выделен из образцов от домашних птиц; <sup>×</sup> - вирус выделен из образцов от свиней											

В результате исследований биоматериала было выделено 50 изолятов вируса гриппа, из которых 37 было представлено высокопатогенными вирусами гриппа А/Н5N8, которые были выделены во время вспышек среди домашней птицы, зарегистрированных в Европейской части России. В Иркутской области был выделен один изолят вируса гриппа А/Н3N2 от свиньи. Также было выделено 3 изолята вируса гриппа А/Н9N2 на территории Приморского края (табл. 26). Помимо этого, от диких птиц было выделено 8 изолятов низкопатогенных вариантов вируса гриппа подтипов А/Н3N6 и А/Н3N8. Нами были изучены и сравнены биологические характеристики некоторых штаммов вируса гриппа А/Н5N8, выделенных в 2018 году, а также штаммов вируса гриппа А/Н3N2 и А/Н9N2, которые также имеют важное эпидемиологическое и эпизоотологическое значение.

### **3.6.1 Изучение вирусов гриппа подтипа Н5Nх**

При титровании в РКЭ изученные штаммы показали высокую степень репродукции. Титр вируса в аллантоисной жидкости находился в диапазоне от 7.9 до 9.3 lg ЭИД50/мл (табл. 27). Несмотря на незначительные различия в титрах между штаммами Н5N8 2018 года, инфекционность штаммов для РКЭ была сопоставима со штаммами, выделенными в России после 2014 года. Для всех штаммов было определено наличие аминокислотной последовательности REKRRKR\*GL в сайте протеолитического расщепления гемагглютинина, что характерно для высокопатогенных штаммов вируса гриппа. Также, изученные штаммы показали высокую степень вирулентности для мышей. При интраназальном заражении мышей Balb/c показатель инфекционной дозы (ИД50) находился в диапазоне 2,1 – 3,6 lg ЭИД50. Также, для штаммов были определены значения летальной дозы (ЛД50), которые составили 3,1 – 4,6 lg ЭИД50. Показатели вирулентности для изученных штаммов были сопоставимы с показателями штаммов вируса гриппа Н5Nх, выделенных ранее, что может свидетельствовать о сохранении высокопатогенных свойств циркулирующих на территории России вирусов гриппа Н5N8.

Таблица 27. Вирусологические свойства вирусов гриппа H5-подтипа

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занамивира/озельтамивира
			ПКЭ	Мыши линии Balb/c		IC50, nM
				IgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	ИД <sub>50</sub> , IgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	
<b>Референс штаммы</b>						
	A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	6.2 ± 0.5	2.9 ± 0.4	4.1 ± 0.4	0.05/0.1
	A/rook/Chany/32/2015	H5N1	8.7 ± 0.4	1.9 ± 0.4	2.9 ± 0.8	29.9/32.9
	A/great crested grebe/Тува/34/2016	H5N8	9.3 ± 0.3	1.7 ± 0.5	2.3 ± 0.5	1.0/0.7
	A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017	H5N8	9.2 ± 0.6	1.9 ± 0.4	2.9 ± 0.6	0.49/0.41
	A/chicken/Kostroma/1718/2017	H5N2	8.9 ± 0.4	1.6 ± 0.6	1.8 ± 0.6	1,69/0,12
<b>Исследуемые штаммы</b>						
1.	A/chicken/Kursk/284/2018	H5N8	9.1 ± 0.4	2.3 ± 0.5	3.6 ± 0.6	0,44/0,43
2.	A/chicken/Kursk/526/2018	H5N8	9.2 ± 0.3	н/д	н/д	0,50/0,46
3.	A/chicken/Kursk/757/2018	H5N8	8.6 ± 0.4	н/д	н/д	0,50/0,39
4.	A/chicken/Kursk/760/2018	H5N8	8.3 ± 0.5	н/д	н/д	0,46/0,42
5.	A/chicken/Kursk/762/2018	H5N8	9.0 ± 0.5	н/д	н/д	0,40/0,40
6.	A/chicken/Samara/446/2018	H5N8	8.6 ± 0.7	2.2 ± 0.5	3.0 ± 0.4	0,54/0,44
7.	A/chicken/Samara/447/2018	H5N8	8.7 ± 0.4	н/д	н/д	0,52/0,40
8.	A/duck/Samara/452/2018	H5N8	9.1 ± 0.4	2.1 ± 0.5	3.1 ± 0.6	0,43/0,41
9.	A/goose/Samara/455/2018	H5N8	8.7 ± 0.4	н/д	н/д	0,41/0,39
10.	A/goose/Samara/459/2018	H5N8	9,3 ± 0,3	н/д	н/д	0,45/0,44
11.	A/goose/Samara/673/2018	H5N8	7,9 ± 0,4	н/д	н/д	0,40/0,39
12.	A/goose/Samara/675/2018	H5N8	8,0 ± 0,6	н/д	н/д	0,39/0,39
13.	A/chicken/Samara/679/2018	H5N8	8,6 ± 0,4	н/д	н/д	0,44/0,42
14.	A/chicken/Penza/300/2018	H5N8	9,3 ± 0,3	2,4 ± 0,5	3,7 ± 0,6	0,42/0,38
15.	A/chicken/Penza/301/2018	H5N8	9,2 ± 0,3	н/д	н/д	0,59/0,62
16.	A/chicken/Penza/605/2018	H5N8	8,6 ± 0,4	н/д	н/д	0,40/0,37
17.	A/chicken/Penza/607/2018	H5N8	8,3 ± 0,5	н/д	н/д	0,43/0,41
18.	A/chicken/Orel/533/2018	H5N8	8,7 ± 0,4	2,4 ± 0,5	3,3 ± 0,5	0,73/0,65
19.	A/chicken/Rostov-on-Don/766/2018	H5N8	9,1 ± 0,4	н/д	н/д	0,63/0,78
20.	A/turkey/Rostov-on-Don/766/2018	H5N8	8,7 ± 0,4	н/д	н/д	0,40/0,39
21.	A/chicken/Cheboksary/805/2018	H5N8	9,5 ± 0,5	3,3 ± 0,5	4,6 ± 0,4	0,35/0,38
22.	A/chicken/Cheboksary/806/2018	H5N8	9,2 ± 0,3	н/д	н/д	0,44/0,33
23.	A/chicken/Cheboksary/849/2018	H5N8	9,0 ± 0,5	н/д	н/д	0,36/0,40
24.	A/chicken/Cheboksary/850/2018	H5N8	8,7 ± 0,4	н/д	н/д	0,41/0,42
25.	A/chicken/Cheboksary/851/2018	H5N8	9,1 ± 0,4	н/д	н/д	0,36/0,36
26.	A/chicken/Cheboksary/853/2018	H5N8	8,7 ± 0,4	н/д	н/д	0,40/0,44
27.	A/chicken/Cheboksary/854/2018	H5N8	8,6 ± 0,4	н/д	н/д	0,49/0,45
28.	A/chicken/Mari El/870/2018	H5N8	9,3 ± 0,4	3,6 ± 0,4	4,2 ± 0,4	0,44/0,43
29.	A/turkey/Rostov-on-Don/1117/2018	H5N8	9,0 ± 0,4	н/д	н/д	0,77 / 0,46
30.	A/chicken/Voronezh/1488/2018	H5N8	8,6 ± 0,4	н/д	н/д	0,61 / 0,52
31.	A/chicken/Voronezh/1491/2018	H5N8	9,3 ± 0,5	н/д	н/д	1,30 / 0,68
32.	A/chicken/Voronezh/1504/2018	H5N8	9,1 ± 0,4	н/д	н/д	0,79 / 0,62
33.	A/chicken/Voronezh/1513/2018	H5N8	8,7 ± 0,4	н/д	н/д	0,88 / 0,72
34.	A/turkey/Rostov-on-Don/02/2018	H5N8	9,1 ± 0,4	н/д	н/д	1,16 / 0,81
35.	A/turkey/Rostov-on-Don/03/2018	H5N8	8,6 ± 0,7	н/д	н/д	0,84 / 0,60
36.	A/turkey/Rostov-on-Don/04/2018	H5N8	8,7 ± 0,4	н/д	н/д	1,25 / 0,80
37.	A/turkey/Rostov-on-Don/05/2018	H5N8	9,1 ± 0,4	н/д	н/д	1,29 / 0,64
38.	A/common gull/Saratov/1676/2018	H5N6	8,9 ± 0,6	2,4 ± 0,5	>7.0	1,81 / 0,53

Примечание: \* - M – среднее значения показателя, Sm – стандартное отклонение.  
ЭИД<sub>50</sub> – 50 % эмбриональная инфицирующая доза; ИД<sub>50</sub> - 50 % инфицирующая доза для мышей линии Balb/c; ЛД<sub>50</sub> – 50 % летальная доза для мышей линии Balb/c; IC<sub>50</sub> – 50% ингибирующая концентрация, н/д – исследования не проводились.

Только штамм A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) отличался от изученных вирусов и не вызывал летальную инфекцию у мышей. Показатель ИД50 для него составил  $>7.0 \lg \text{ЭИД50}$ .

Все изученные штаммы были чувствительны к действию противовирусных препаратов – ингибиторов нейраминидазы озельтамивиру и занамивиру, что было продемонстрировано флюоресцентным методом измерения ингибирования нейраминидазы (Fluorometric Neuraminidase Inhibition Assay).

Антигенные свойства выделенных штаммов дополнительно были исследованы в реакции торможения гемагглютинации с использованием референс антигенов и сывороток крови хорьков, полученных на референс антигены, а также на антигены ранее выделенных в России штаммов вируса гриппа H5 (табл. 28). Результаты показали, что все изученные штаммы H5N8 подтипа имеют высокую степень антигенного родства со штаммами вируса гриппа H5N8, циркулировавшими ранее в России, а также рекомендованными ВОЗ кандидатными вакцинными штаммами клады 2.3.4.4. При этом штамм A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) не проявил сродства ни с одной из исследуемых сывороток. Тем не менее, филогенетический анализ гена НА вновь выделенных в России штаммов H5 определил их высокую степень идентичности и принадлежность к кладе 2.3.4.4, включая штамм A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) (рис. 19). При этом, в отличие от кандидатных вакцинных штаммов клады 2.3.4.4 2016-2017, и штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8), выделенного ранее, все штаммы подтипа H5N8 относятся к группе В штаммов клады 2.3.4.4. Изученные штаммы показывают высокую степень идентичности с кандидатными вакцинными штаммами клады 2.3.4.4, предложенными ВОЗ в 2018 году. Штамм A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) был отнесен к группе h вирусом клады 2.3.4.4.

Таблица 28. Результаты РТГА со штаммами вируса гриппа H5-подтипа

Штамм	Подтип	Клада	Сыворотка									
			A/rook/Chany/32/2015	A/duck/England/36254/2014	A/Nothorn Pintail/WA/40964/2014	A/Sichuan/26221/2014-RG42A	A/gyrfalcon/WA/41088/2014-RG43A	A/great crested grebe/Tyva/34/2016	A/wigeon/Sakha/1/2014	A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017	A/chicken/Kostroma/1718/2017	A/common gull/Saratov/1676 /2018
			2.3.2.1c	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4
<b>Референс антигены</b>			<b>Обратные итры антител</b>									
A/rook/Chany/32/2015	H5N1	2.3.2.1c	320	<20	160	<20	<20	640	<20	<20	<20	<20
A/duck/England/36254/2014	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	1280	1280	2560	<20
A/Nothorn Pintail/WA/40964/2014	H5N2	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	640	2560	<20
A/Sichuan/26221/2014 RG42A	H5N6	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	320	320	1280	<20
A/gyrfalcon/WA/41088/2014 RG43A	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	1280	1280	1280	1280	1280	<20
A/great crested grebe/Tyva/34/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	320	320	1280	<20
A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	2560	5120	640	1280	1280	640	1280	<20
A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	320	2560	<20
A/chicken/Kostroma/1718/2017	H5N2	2.3.4.4	<20	640	10240	2560	640	640	160	640	5120	<20
A/common gull/Saratov/1676 /2018	H5N6	2.3.4.4	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	640
<b>Исследуемые антигены</b>												
A/chicken/Kursk/284/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	5120	640	1280	1280	640	5120	<20
A/chicken/Kursk/526/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	320	5120	2560	640	640	640	320	1280	<20
A/chicken/Kursk/757/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	5120	320	1280	1280	640	5120	<20
A/chicken/Kursk/760/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	<320	2560	1280	<160	320	320	160	640	<20
A/chicken/Kursk/762/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	320	10240	2560	160	640	640	320	2560	<20
A/chicken/Samara/446/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	2560	320	640	640	320	2560	<20
A/chicken/Samara/447/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	2560	320	640	640	320	2560	<20

A/duck/Samara/452/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	5120	320	640	640	320	2560	<20
A/goose/Samara/455/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	320	10240	2560	320	640	640	320	1280	<20
A/goose/Samara/459/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	5120	320	1280	1280	320	2560	<20
A/goose/Samara/673/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	5120	320	1280	1280	320	2560	<20
A/goose/Samara/675/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	320	10240	2560	320	640	640	320	2560	<20
A/chicken/Samara/679/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	2560	320	1280	1280	320	2560	<20
A/chicken/Penza/300/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	1280	10240	5120	320	1280	1280	640	5120	<20
A/chicken/Penza/301/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	5120	640	1280	1280	640	5120	<20
A/chicken/Penza/605/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	2560	320	1280	1280	320	2560	<20
A/chicken/Penza/607/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	320	5120	1280	160	320	320	160	1280	<20
A/chicken/Orel/533/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	320	10240	2560	320	1280	640	320	2560	<20
A/chicken/Rostov-on-Don/766/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	320	5120	1280	320	320	320	160	1280	<20
A/turkey/Rostov-on-Don/817/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	320	5120	2560	320	640	320	320	1280	<20
A/chicken/Cheboksary/805/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	5120	320	1280	1280	640	5120	<20
A/chicken/Cheboksary/806/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	5120	320	1280	640	320	2560	<20
A/chicken/Cheboksary/849/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	320	5120	1280	160	640	320	160	1280	<20
A/chicken/Cheboksary/850/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	2560	320	640	640	320	2560	<20
A/chicken/Cheboksary/851/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	2560	320	640	1280	320	2560	<20
A/chicken/Cheboksary/853/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	1280	10240	5120	640	1280	640	640	2560	<20
A/chicken/Cheboksary/854/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	2560	320	640	1280	320	2560	<20
A/chicken/Mari El/870/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	1280	10240	5120	640	1280	640	640	2560	<20
A/turkey/Rostov-on-Don/1117/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	5120	640	1280	1280	640	2560	<20
A/chicken/Voronezh/1488/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	320	5120	2560	320	640	640	320	1280	<20
A/chicken/Voronezh/1491/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	2560	320	1280	640	640	2560	<20
A/chicken/Voronezh/1504/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	5120	320	1280	640	640	2560	<20
A/chicken/Voronezh/1513/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	5120	320	1280	640	640	2560	<20
A/turkey/Rostov-on-Don/02/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	5120	320	1280	1280	640	2560	<20
A/turkey/Rostov-on-Don/03/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	5120	640	1280	1280	640	2560	<20
A/turkey/Rostov-on-Don/04/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	2560	320	1280	640	320	2560	<20
A/turkey/Rostov-on-Don/05/2018	H5N8	<b>2.3.4.4</b>	<20	640	10240	2560	320	1280	640	320	2560	<20

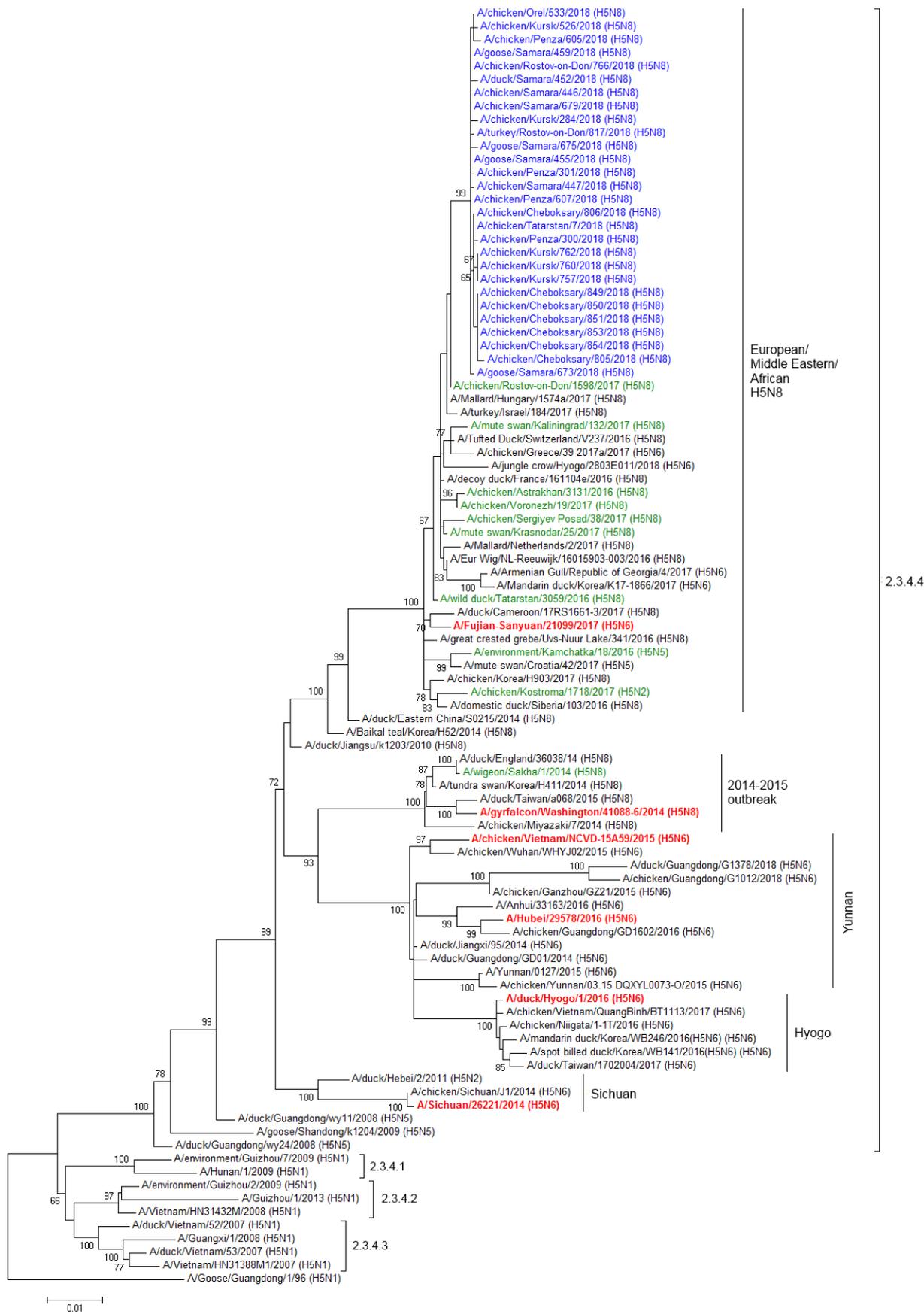


Рисунок 19- Филогенетический анализ гена HA штаммов вируса гриппа H5. Исследуемые штаммы выделены синим. Кандидатные вакцинные штаммы выделены красным. Штаммы, выделенные в России до 2018 г. отмечены зеленым. Дерево построено с помощью программы MEGA 6.06 (<http://www.megasoftware.net/>), используя метод maximum likelihood с 500 bootstrap повторами.

У изученных штаммов был выявлен ряд мутаций, отвечающих за вирулентность и изменение хозяйской специфичности. Так, при анализе аминокислотной последовательности НА были выявлены замены N110S, A149T, T139P, N205D. Подобные замены по литературным данным обуславливают усиление рецепторного взаимодействия с  $\alpha$ 2-6 остатками сиаловых кислот. В NS1 были выявлены две мутации V226I, E227G, которые отвечают за вирулентность и, в частности, за ее усиление. Также в PB2 была выявлена мутация R368Q. Ранее было показано, что мутации в данной позиции могут влиять на адаптацию вирусов к передаче от человека к человеку. Таким образом, нами получена важная информация, которая может использоваться при оценке пандемического риска циркулирующих вариантов вируса гриппа.

### 3.6.2 Изучение вирусов гриппа подтипа H9N2

В мае 2018 года на территории Приморского края во время вспышки среди домашней птицы было выделено 2 штамма вируса гриппа A(H9N2). Также, один штамм был выделен во время вспышки в том же регионе в декабре 2018 года. При титровании на РКЭ изученные штаммы показали высокую

Таблица 29. Биологические свойства вирусов гриппа A/H5 и A/H9N2.

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занамивира/ озельтамивира
			РКЭ	Мыши линии Balb/c		
			IgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	ИД <sub>50</sub> , IgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	ЛД <sub>50</sub> , IgЭИД <sub>50</sub> /мл (M±Sm)*	IC50, nM
<b>Референс штаммы</b>						
1	A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	6.2 ± 0.5	2.9 ± 0.4	4.1 ± 0.4	0.05/0.1
2	A/rook/Chany/32/2015	H5N1	8.7 ± 0.4	1.9 ± 0.4	2.9 ± 0.8	0.35/0.55
3	A/great crested grebe/Tyva/34/2016	H5N8	9.3 ± 0.3	1.7 ± 0.5	2.3 ± 0.5	1.0/0.7
4	A/chicken/Kostroma/1718/2017	H5N2	8.9 ± 0.4	1.6 ± 0.6	1.8 ± 0.6	1.69/0.12
<b>Изучаемые штаммы</b>						
1	A/chicken/Primorsky Krai/03/2018	H9N2	8.9 ± 0.4	>7.0	>7.0	0.69/0.53
2	A/chicken/Primorsky Krai/05/2018	H9N2	9.0 ± 0.4	>7.0	>7.0	0.59/0.45
3	A/chicken/Primorsky_Krai/1771/2018	H9N2	9.1 ± 0.4	>7.0	>7.0	0.64 / 0.04

Примечание: \*- M – среднее значения показателя, Sm – стандартное отклонение.  
 ЭИД50 – 50 % эмбриональная инфицирующая доза; ИД50 - 50 % инфицирующая доза для мышей линии Balb/c; ЛД50 – 50 % летальная доза для мышей линии Balb/c; IC50 – 50% ингибирующая концентрация.

степень репродукции. Титр вируса в аллантоисной жидкости находился в диапазоне 8.9 – 9.1 Ig ЭИД50/мл. При интраназальном заражении мышей

Balb/c штаммы оказались не патогенными и не инфекционными для данных лабораторных животных (табл. 29).

Все изученные штаммы были чувствительны к действию противовирусных препаратов – ингибиторов нейраминидазы озельтамивиру и занамивиру, что было продемонстрировано флюоресцентным методом измерения ингибирования нейраминидазы (Fluorometric Neuraminidase Inhibition Assay).

Антигенные свойства штаммов были изучены в реакции торможения гемагглютинации в сравнении с кандидатным вакцинным штаммом A/Hong Kong/308/2014 (H9N2) с использованием сыворотки крови хорька, полученной на изучаемые штаммы, и суспензии эритроцитов петуха. Результаты, представленные в таблице 30, показали, что исследованные штаммы отличались от кандидатного вакцинного штамма A/Hong Kong/308/2014 (H9N2), который относится к генетической группе Y280/G9, также как и изученные штаммы, что было показано при филогенетическом анализе гена HA (рис. 20).

Таблица 30. Результаты РТГА со штаммами вируса гриппа H9N2

Штамм	Подтип	Клада	Сыворотка	
			A/chicken/Primorsky Krai/03/2018 (H9N2)	A/chicken/Primorsky Krai/1771/2018 (H9N2)
<b>Референс антиген</b>			<b>Обратные итры антител</b>	
A/Hong Kong/308/2014	H9N2	Y280	320	320
<b>Исследуемые антигены</b>				
A/chicken/Primorsky Krai/03/2018	H9N2	Y280	<b>2560</b>	2560
A/chicken/Primorsky Krai/1771/2018	H9N2	Y280	1280	<b>1280</b>
A/chicken/Primorsky Krai/05/2018	H9N2	Y280	2560	2560

При этом, вирус A/mallard/Tomsk/1391/2018 (H9N2), циркуляция которого была нами зарегистрирована на территории Томской области (вирус выделен не был), относился к генетической кладе Y439. В то же время, в базе данных GISAID имеется информация о штамме A/chicken/Amur\_Russia/17/2018 (H9N2), который был выделен в 2018 году на территории Амурской области. Проведенный филогенетический анализ определил его принадлежность к кладе G1 вирусов гриппа A/H9N2. Таким образом, на территории Российской Федерации в 2018 году была

зафиксирована циркуляция вирусов подтипа А/Н9N2 трех различных генетических линий.

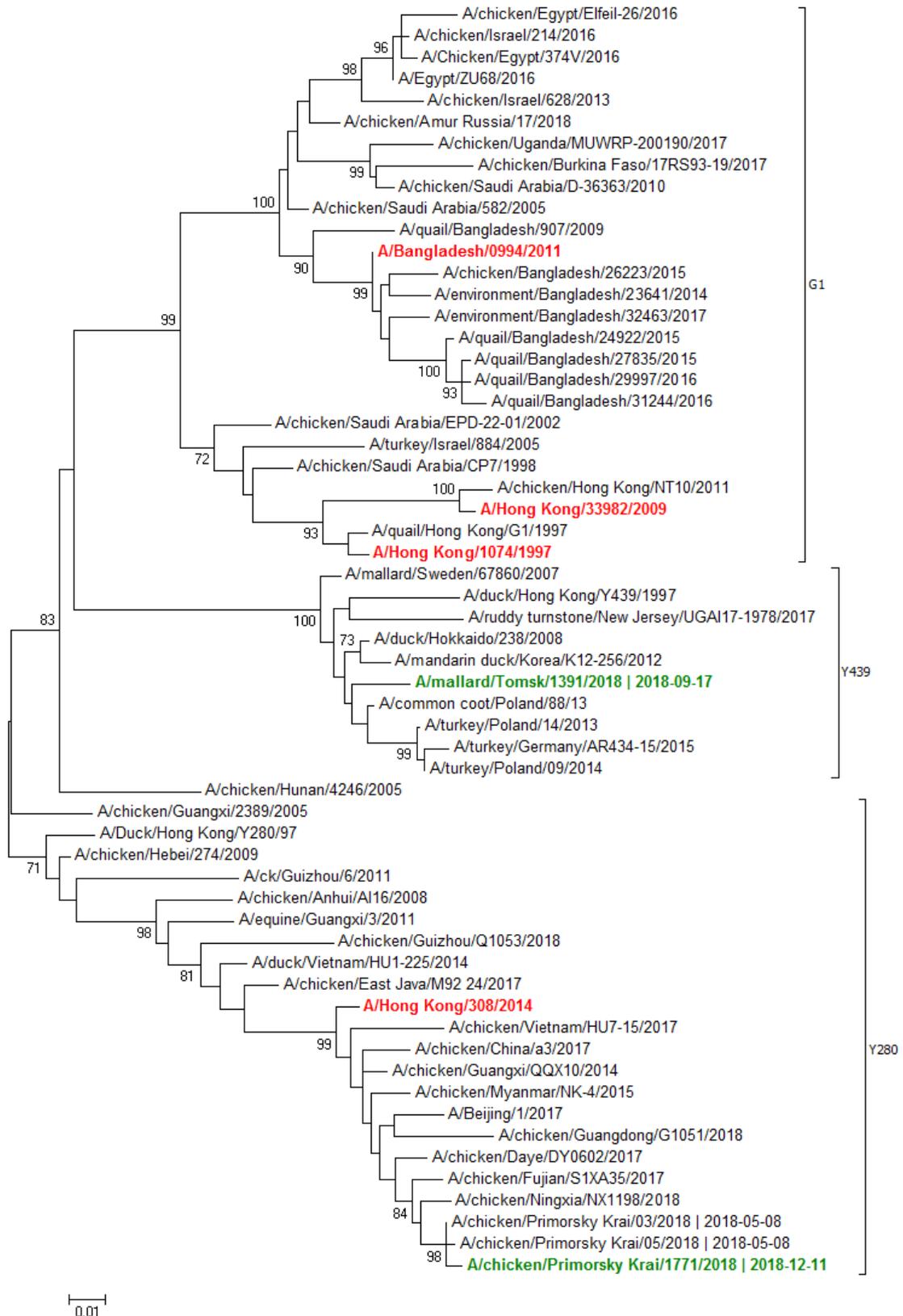


Рисунок 20. Филогенетический анализ гена НА вирусов гриппа А(Н9N2). Штаммы, выделенные в России, выделены зеленым. Кандидатные вакцинные штаммы выделены красным.

### 3.6.3 Изучение вирусов гриппа подтипа H3N2sw

В ходе мониторинга вируса гриппа на территории Иркутской области в 2017 и 2018 гг. от свиней был выделен вирус гриппа A(H3N2). При этом, у свиней не наблюдалось клинических признаков заболевания.

Сравнительный анализ антигенных свойств вирусов гриппа A(H3N2), выделенных от свиней осенью 2017 г. и весной 2018 г., был проведен с использованием референс сыворотки крови хорька и референс анти-A/H3N2 сывороткой козы, полученной из IRR (Influenza reagent resource). При постановке РТГА с эритроцитами морской свинки штаммы вируса гриппа свиней, выделенные на территории Иркутской области, не были распознаны ни одной из сывороток крови хорька, полученных на сезонные штаммы вируса гриппа A(H3N2). Только гипериммунная анти-A/H3N2 сыворотка козы проявила антигенное сродство с исследуемыми штаммами вируса гриппа свиней, однако, в значительно более низких титрах, чем со штаммами сезонных вирусов гриппа A(H3N2) (табл. 31).

При этом, для тех антигенов, которые способны агглютинировать эритроциты гуся в присутствии озельтамивира, РТГА была повторно проведена с этим видом эритроцитов. В результате было показано, что титры при постановке РТГА с гипериммунной анти-A/H3N2 сывороткой козы и штаммами вируса гриппа свиней, выделенными на территории Иркутской области, были выше, чем при постановке РТГА с эритроцитами морской свинки. Также, при постановке РТГА с сыворотками, полученными на референс штаммы A/Fujian/411/2002, A/Rhode Island/01/2010, A/Victoria/361/2011 и A/Hong Kong/4801/2014 и антигенами штаммов вируса гриппа свиней, было показано их взаимодействие, но в низких титрах (табл. 32).

Таблица 31 - Результаты РТГА со штаммами вируса гриппа А(Н3N2) с эритроцитами морской свинки в присутствии 20 нМ озельтамивира

Штамм	Подтип	клада	Референс сыворотка крови хорька (IRR)											2016-2017 WHO A(H3) Reference Goat Antiserum
			H3N2									H3N2v		
			A/Fujian/411/2002	A/Brisbane/10/2007	A/Perth/16/2009	A/Rhode Island/01/2010	A/Victoria/361/2011	A/Texas/50/2012	A/New York/39/2012	A/Switzerland/9715293/2013	A/Hong Kong/4801/2014	A/Minnesota/11/2010	A/Indiana/8/2011	
						4	3C.1	3C.1	3C.3	3C.3a	3C.2a			
<b>Референс антигены</b>			<b>Обратные титры антител</b>											
A/Perth/16/2009	H3N2		<20	20	<b>640</b>	320	80	160	160	20	80	<20	<20	≥5120
A/Victoria/361/2011	H3N2	3C.1	<20	160	640	1280	<b>160</b>	640	1280	160	160	20	40	≥5120
A/Texas/50/2012	H3N2	3C.1	40	320	1280	2560	640	<b>1280</b>	2560	640	640	40	80	≥5120
A/New York/39/2012	H3N2	3C.3	<20	80	640	1280	320	640	<b>1280</b>	160	320	<20	<20	≥5120
A/Switzerland/9715293/2013	H3N2	3C.3a	<20	40	160	320	40	160	160	<b>1280</b>	320	20	40	≥5120
A/Hong Kong/4801/2014	H3N2	3C.2a	<20	<20	80	320	40	160	80	<20	<b>2560</b>	<20	<20	≥5120
A/Minnesota/11/2010	H3N2v		<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<b>640</b>	320	80
<b>Исследуемые антигены</b>														
A/Astrakhan/32/2017	H3N2	3C.2a1b	<20	20	160	80	40	160	160	40	160	<20	<20	≥5120
A/St. Petersburg/646/2018	H3N2		<20	20	80	160	20	-	160	80	320	<20	<20	≥5120
A/swine/Irkutsk/155/2017	H3N2		<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	320
A/swine/Irkutsk/158/2017	H3N2		<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	320
A/swine/Irkutsk/182/2017	H3N2		<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	320
A/swine/Irkutsk/85/2018	H3N2		<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	160

Таблица 32 - Результаты РТГА со штаммами вируса гриппа А(Н3N2) с эритроцитами гуся

Штамм	Подтип	клада	Референс сыворотка крови хорька (IRR)											2016-2017 WHO A(H3) Reference Goat Antiserum
			H3N2									H3N2v		
			A/Fujian/411/2002	A/Brisbane/10/2007	A/Perth/16/2009	A/Rhode Island/01/2010	A/Victoria/361/2011	A/Texas/50/2012	A/New York/39/2012	A/Switzerland/9715293/2013	A/Hong Kong/4801/2014	A/Minnesota/11/2010	A/Indiana/8/2011	
						4	3C.1	3C.1	3C.3	3C.3a	3C.2a			
<b>Референс антигены</b>			<b>Обратные титры антител</b>											
A/Texas/50/2012	H3N2	3C.1	40	640	2560	2560	1280	<b>5120</b>	5120	640	640	40	80	≥5120
A/Switzerland/9715293/2013	H3N2	3C.3a	<20	40	160	320	80	1280	640	<b>2560</b>	320	20	40	≥5120
A/Minnesota/11/2010	H3N2v		<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<b>1280</b>	640	160
<b>Исследуемые антигены</b>														
A/Astrakhan/32/2017	H3N2	3C.2a1b	<20	40	320	640	160	-	640	80	1280	<20	<20	≥5120
A/St. Petersburg/646/2018	H3N2		20	40	320	640	160	-	1280	160	1280	20	20	≥5120
A/swine/Irkutsk/155/2017	H3N2		80	<20	<20	80	20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	5120
A/swine/Irkutsk/158/2017	H3N2		80	<20	<20	80	40	<20	<20	<20	20	<20	<20	5120
A/swine/Irkutsk/182/2017	H3N2		80	<20	<20	80	40	<20	<20	<20	<20	<20	<20	5120
A/swine/Irkutsk/85/2018	H3N2		80	<20	<20	40	<20	<20	<20	<20	40	<20	<20	2560

При этом, ни одна из референс сывороток хорьков не ингибировала цитопатическое действие штамма A/swine/Irkutsk/155/2017 при постановке реакции нейтрализации (табл. 33).

Таблица 33 - Результаты реакции нейтрализации со штаммами вируса гриппа А(Н3N2)

Штамм	Подтип	клада	Референс сыворотка крови хорька (IRR)										
			H3N2									H3N2v	
			A/Fujian/411/2002	A/Brisbane/10/2007	A/Perth/16/2009	A/Rhode Island/01/2010	A/Victoria/361/2011	A/Texas/50/2012	A/New York/39/2012	A/Switzerland/9715293/2013	A/Hong Kong/4801/2014	A/Minnesota/11/2010	A/Indiana/8/2011
<b>Референс антигены</b>			Обратные титры антител										
A/Victoria/361/2011	H3N2	3C.1	<20	20	640	640	<b>40</b>	320	640	160	80	<20	20
A/Texas/50/2012	H3N2	3C.1	<20	<20	40	160	40	<b>320</b>	160	<20	20	<20	<20
A/Hong Kong/4801/2014	H3N2	3C.2a	-	-	-	-	-	-	-	20	<b>640</b>	-	-
A/Minnesota/11/2010	H3N2v		<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<b>160</b>	80
<b>Исследуемый антиген</b>													
A/swine/Irkutsk/155/2017	H3N2		<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20

Также, все изученные штаммы были чувствительны к действию противовирусных препаратов – ингибиторов нейраминидазы озельтамивиру и занамивиру.

Филогенетический анализ гена НА штаммов вируса гриппа свиней, выделенных на территории Иркутской области, показал, что изученные штаммы имеют высокую степень идентичности с вакцинными штаммами вируса гриппа свиней H3N2.

Таким образом, результаты исследования выявленных вирусов гриппа свиней указывают на то, что, скорее всего, изученные штаммы являются классическими вирусами гриппа свиней, о чем свидетельствует их антигенное и генетическое отличие от вирусов сезонного гриппа человека несмотря на то, что в некоторых случаях наблюдалось взаимодействие антигенов вирусов с референс-сыворотками.

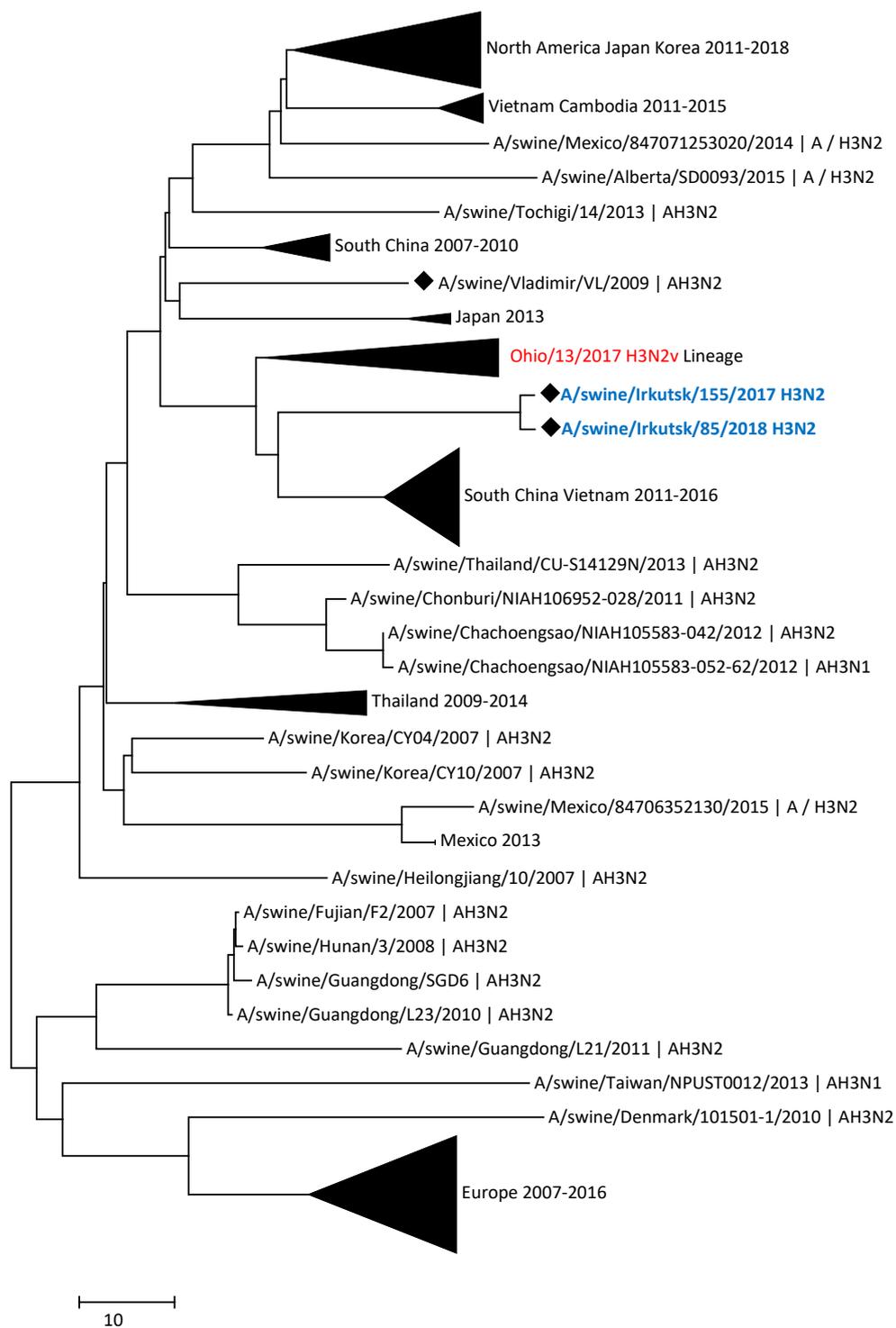


Рисунок 21 - филогенетический анализ гена HA вирусов гриппа свиней А(Н3N2). Штаммы, выделенные в России выделены синим. Вакцинный штамм выделен красным

К 2018 году количество регионов Российской Федерации, в которых осуществлялся мониторинг ВГП, достигло 43, таким образом за 6 лет исследований система мониторинга стала покрывать значительную часть страны, при этом, сбор и анализ биоматериала систематически осуществлялся

в ключевых точках распространения ВГП. Это позволило выявить широкое разнообразие вариантов вируса гриппа, включая выделение эпидемиологически важных подтипов. Так, в 2018 году на территории Иркутской области был повторно выявлен вирус гриппа свиней подтипа H3N2, что может указывать на сохранение данного варианта на территории Иркутской области и его длительную циркуляцию. Помимо этого, весной 2018 года был выявлен занос вируса гриппа подтипа H9N2 на территорию Дальнего Востока России. Вирус был выделен от сельскохозяйственных птиц во время вспышки на территории Приморского края. При этом, циркуляция данного подтипа продолжалась в течение года. Вирус гриппа подтипа H9N2 выделен нами на территории Приморского края и осенью 2018 года (штамм A/chicken/Primorsky Krai/1771/2018). Данные штаммы были антигенно и генетически близки. Вероятно, вирус гриппа H9N2 был занесен на территорию Дальнего Востока с дикими птицами, о чем свидетельствует выявление РНК вируса гриппа H9N2 в биоматериале от дикой птицы на территории Томской области. Мониторинг вируса гриппа среди диких птиц также позволил впервые выявить на территории России циркуляцию вируса гриппа подтипа H5N6 (штамм A/common gull/Saratov/1676/2018), который, вероятно, был занесен на территорию России из стран Юго-Восточной Азии, о чем свидетельствует идентичность нуклеотидных последовательностей генома со штаммами, выделенными на территории Вьетнама (последовательности депонированы в GISAID под номером EPI\_ISL\_336925).

Таким образом, комплексная система мониторинга ВГП позволила на протяжении нескольких лет на ранних этапах выявлять циркуляцию различных вирусов гриппа среди диких и домашних животных, а также углубленно изучать биологические свойства наиболее важных в эпидемиологическом и эпизоотологическом значении вариантов, что позволяет оценить его эпидемический потенциал и пути проникновения вируса на территорию нашей страны и распространения в природе.

### **3.7 Серологический мониторинг вируса гриппа птиц**

В 2016-2017 году была зафиксирована масштабная эпизоотия среди диких и сельскохозяйственных птиц в европейской части России, вызванная высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N8). Наиболее крупные вспышки среди сельскохозяйственной птицы регистрировались на птицефабриках и частных подворьях республик Калмыкия, Татарстан, Удмуртия, а также в Нижегородской, Астраханской и Воронежской областях. В каждом регионе был произведен сбор образцов сывороток крови у людей, контактировавших с павшей птицей (фермеры, сотрудники птицефабрик) для оценки уровня антител к высокопатогенному вирусу гриппа (табл. 34).

Помимо этого, в ходе мониторинга вируса гриппа птиц на территории России, был осуществлен сбор образцов сывороток крови у людей, которые контактировали с дикой птицей (охотники), на территории Тульской и Астраханской областей.

Так, в ходе вспышки на территории Удмуртской республики было собрано 9 образцов сывороток крови от 9 человек, на чьих подворьях была отмечена гибель домашней птицы. В результате исследования сывороток методом РТГА антител к вирусам гриппа А(Н5N1), А(Н5N8), А(Н7N9) и А(Н9N2) в образцах выявлено не было.

Также не было выявлено антител к вышеуказанным подтипам вируса гриппа в 21 образце сывороток крови, взятых от людей, занимающихся охотой и регулярно контактирующих с дикой птицей, проживающих на территории Тульской и Астраханской областей.

Антитела к вирусам гриппа Н5, Н7, Н9 не были выявлены и у людей, контактировавших с павшей птицей на частных подворьях республики Татарстан. При этом, были собраны парные сыворотки крови, т.е. образцы отбирались в первые дни вспышки и через 21 день.

Следует особо отметить вспышку гриппа в зоопарке г. Воронеж, где в марте 2017 года от вируса А(Н5N8) погибла коллекция редких птиц.

Результаты исследования сывороток также не выявили антител к вирусам гриппа А(Н5N1), А(Н5N8), А(Н7N9) и А(Н9N2) у сотрудников зоопарка.

Таблица 34. Результаты сбора и анализа сывороток крови от людей.

Регион сбора	Место сбора	Всего проб	Подтипы	Количество положит-х сывороток	% положит-х сывороток
Удмуртская республика	Частный сектор	9	A(H5N1)	0	0
			A(H5N8)	0	0
			A(H9N2)	0	0
			A(H7N9)	0	0
Республика Татарстан	Птицефабрика	58	A(H5N1)	0	0
			A(H5N8)	0	0
			A(H9N2)	0	0
			A(H7N9)	0	0
Тульская область	Частный сектор (охотники)	11	A(H5N1)	0	0
			A(H5N8)	0	0
			A(H9N2)	0	0
			A(H7N9)	0	0
Астраханская область	Частный сектор (охотники)	10	A(H5N1)	0	0
			A(H5N8)	0	0
			A(H9N2)	0	0
			A(H7N9)	0	0
Астраханская область	Птицефабрика	47	A(H5N1)	31	66
			A(H5N8)	0	0
			A(H9N2)	0	0
			A(H7N9)	0	0
Нижегородская область	Частный сектор	20 (парные)	A(H5N1)		
			A(H5N8)	18/20; 17/20	90/85
			A(H9N2)	0	0,0
			A(H7N9)	0	0,0
Ростовская область	Птицефабрика	36	A(H5N1)	31	86,1
			A(H5N8)	6	16,7
			A(H9N2)	0	0,0
			A(H7N9)	0	0,0
Республика Калмыкия	Частный сектор	54	A(H5N1)	1	1,9
			A(H5N8)	26	48,1
			A(H9N2)	0	0,0
			A(H7N9)	0	0,0
Воронежская область	Зоопарк	24	A(H5N1)	0	0
			A(H5N8)	0	0
			A(H9N2)	0	0
			A(H7N9)	0	0

Тем не менее, при анализе сывороток крови, полученных от людей, проживающих на территориях Астраханской, Нижегородской и Ростовской областей, а также республики Калмыкия, было выявлено наличие антител к вирусам гриппа А(Н5N1) и А(Н5N8).

Так, в республике Калмыкия, где на частных подворьях была зарегистрирована одна из первых вспышек высокопатогенного гриппа в конце 2016 года, было собрано 54 образца сывороток крови от людей, контактировавших с павшей птицей (табл. 35).

Таблица 35. Титры антител в сыворотках крови, собранных на территории Республики Калмыкия.

№ Сыв-ки	Подтип вируса				№ Сыв-ки	Подтип вируса			
	H5N1	H5N8	H7N9	H9N2		H5N1	H5N8	H7N9	H9N2
1	-	-	-	-	28	1/20	-	-	-
2	-	-	-	-	29	1/20	-	-	-
3	1/80	-	-	-	30	1/20	-	-	-
4	1/80	-	-	-	31	-	-	-	-
5	-	1/80	-	-	32	-	-	-	-
6	-	-	-	-	33	1/40	-	-	-
7	-	-	-	-	34	-	-	-	-
8	-	-	-	-	35	-	-	-	-
9	-	-	-	-	36	1/20	-	-	-
10	1/80	-	-	-	37	1/20	-	-	-
11	1/40	-	-	-	38	-	-	-	-
12	1/40	-	-	-	39	1/20	-	-	-
13	1/20	-	-	-	40	1/20	-	-	-
14	1/20	-	-	-	41	-	-	-	-
15	1/40	-	-	-	42	-	-	-	-
16	1/40	-	-	-	43	-	-	-	-
17	-	-	-	-	44	1/20	-	-	-
18	-	-	-	-	45	-	-	-	-
19	-	-	-	-	46	1/40	-	-	-
20	1/20	-	-	-	47	-	-	-	-
21	-	-	-	-	48	-	-	-	-
22	-	-	-	-	49	1/20	-	-	-
23	1/40	-	-	-	50	-	-	-	-
24	-	-	-	-	51	-	-	-	-
25	-	-	-	-	52	-	-	-	-
26	1/40	-	-	-	53	-	-	-	-
27	1/40	-	-	-	54	1/20	-	-	-

Примечание: «-» соответствует титру антител <1/20

При исследовании сывороток крови, собранных на территории Республики Калмыкия, методом РТГА значимые титры антител к высокопатогенным вирусам гриппа были выявлены в 26 образцах, что составило 48% от всех проб. При этом в 25 случаях были выявлены антитела к вирусу гриппа подтипа H5N1, в одной сыворотке были выявлены антитела к вирусу гриппа подтипа H5N8 в титре 1/80. В половине положительных образцов (n=13) к вирусу гриппа подтипа H5N1 уровень антител находился на уровне 1/20, тогда как в девяти случаях показатель уровня антител был равен 1/40 и в трех случаях титр антител был равен 1/80. Антител к вирусам гриппа A(H7N9) и A(H9N2) в образцах выявлено не было.

Таблица 36. Титры антител в сыворотках крови, собранных на территории Ростовской области.

№ Сыв-ки	Подтип вируса				№ Сыв-ки	Подтип вируса			
	H5N1	H5N8	H7N9	H9N2		H5N1	H5N8	H7N9	H9N2
1	-	-	-	-	19	1/40	-	-	-
2	≥1/80	-	-	-	20	1/40	-	-	-
3	≥1/80	-	-	-	21	≥1/80	-	-	-
4	1/40	1/20	-	-	22	≥1/80	1/20	-	-
5	≥1/80	-	-	-	23	1/40	-	-	-
6	≥1/80	-	-	-	24	1/20	-	-	-
7	1/40	-	-	-	25	-	-	-	-
8	1/40	-	-	-	26	≥1/80	1/20	-	-
9	1/20	-	-	-	27	1/40	1/20	-	-
10	1/40	-	-	-	28	≥1/80	-	-	-
11	1/40	-	-	-	29	≥1/80	1/40	-	-
12	1/80	-	-	-	30	≥1/80	1/20	-	-
13	1/20	-	-	-	31	≥1/80	-	-	-
14	1/20	-	-	-	32	≥1/80	-	-	-
15	1/20	-	-	-	33	≥1/80	-	-	-
16	1/20	-	-	-	34	-	-	-	-
17	1/20	-	-	-	35	-	-	-	-
18	≥1/80	-	-	-	36	-	-	-	-

Примечание: «-» соответствует титру антител <1/20

При исследовании в РТГА сывороток крови от сотрудников птицефабрики, проживающих на территории Ростовской области, была

выявлена схожая ситуация (табл. 36). При этом, из 36 собранных образцов антитела к высокопатогенным вирусам гриппа были выявлены в 31 образце, что составило 86% от всех проб. Во всех положительных случаях были выявлены антитела к вирусу гриппа подтипа H5N1, из них в шести сыворотках также были выявлены антитела к вирусу гриппа подтипа H5N8. Значения показателей уровня антител к вирусу гриппа подтипа H5N8 составили в основном 1/20. При этом титры антител к вирусам гриппа подтипа H5N1 в целом были выше. В 15 из 31 положительных образцов титр антител составил  $\geq 1/80$ . Антител к вирусам гриппа A(H7N9) и A(H9N2) в образцах выявлено не было.

Таблица 37. Титры антител в парных сыворотках крови, собранных на территории Нижегородской области.

№ Сыв-ки (первые)	Подтип вируса				№ Сыв-ки (вторые)	Подтип вируса			
	H5N1	H5N8	H7N9	H9N2		H5N1	H5N8	H7N9	H9N2
1	-	1/80	-	-	1	-	1/80	-	-
2	-	1/80	-	-	2	-	1/80	-	-
3	-	1/80	-	-	3	-	1/80	-	-
4	-	1/160	-	-	4	-	1/160	-	-
5	-	1/80	-	-	5	-	1/80	-	-
6	-	1/80	-	-	6	-	1/80	-	-
7	-	1/20	-	-	7	-	1/20	-	-
8	-	1/80	-	-	8	-	1/80	-	-
9	-	1/80	-	-	9	-	1/80	-	-
10	-	1/160	-	-	10	-	1/160	-	-
11	-	1/80	-	-	11	-	1/40	-	-
12	-	1/80	-	-	12	-	1/80	-	-
13	-	1/80	-	-	13	-	1/80	-	-
14	-	1/160	-	-	14	-	1/160	-	-
15	-	1/80	-	-	15	-	1/80	-	-
16	-	1/40	-	-	16	-	-	-	-
17	-	-	-	-	17	-	-	-	-
18	-	1/20	-	-	18	-	-	-	-
19	-	-	-	-	19	-	1/80	-	-
20	-	1/80	-	-	20	-	1/80	-	-
Примечание: «-» соответствует титру антител <1/20									

При анализе парных сывороток крови людей, проживающих на территории Нижегородской области, контактировавших во время вспышки с больной и павшей птицей, также был выявлен высокий процент положительных проб (табл. 37).

Из 20 сывороток от контактных людей, собранных в первый день вспышки, которая была вызвана высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N8), в 18 случаях были выявлены значимые титры антител к данному подтипу вируса гриппа. Из 20 сывороток от тех же людей, собранных на 21 день после контакта с больной или павшей птицей, антитела к вирусу гриппа А(Н5N8) были выявлены в 17 случаях. Уровень антител находился в диапазоне от 1/20 до 1/160, однако, стоит отметить, что в большинстве случаев титры антител к вирусам гриппа в первой сыворотке были равны титрам антител во второй сыворотке, за исключением одного случая, когда во второй сыворотке антител к вирусу гриппа выявлено не было. Также стоит отметить один случай, в котором наблюдалась сероконверсия. В первой сыворотке №19 антител к вирусу гриппа А(Н5N8) выявлено не было, тогда как во второй титр антител находился на уровне 1/80. Ни в одной из сывороток антител к вирусам гриппа А(Н5N1), А(Н7N9) и А(Н9N2) выявлено не было.

При анализе в РТГА 47 проб сывороток крови от сотрудников птицефабрики Астраханской области, где была зарегистрирована вспышка высокопатогенного вируса гриппа А(Н5N8), было выявлено 66% положительных образцов (табл. 38). В 31 положительных пробах были выявлены антитела к вирусу гриппа А(Н5N8). При этом уровень антител в сыворотках крови находился в диапазоне от 1/40 до  $\geq 1/160$ , что является значимыми показателями. Антител к высокопатогенным вирусам гриппа А(Н5N1), А(Н7N9) и А(Н9N2) в образцах сывороток крови выявлено не было.

Таблица 38. Значение титра антител в парных сыворотках крови, собранных на территории Астраханской области.

№ Сыв-ки (первые)	Подтип вируса				№ Сыв-ки (вторые)	Подтип вируса			
	H5N1	H5N8	H7N9	H9N2		H5N1	H5N8	H7N9	H9N2
1	-	1/80	-	-	25	-	1/40	-	-
2	-	-	-	-	26	-	-	-	-
3	-	-	-	-	27	-	1/40	-	-
4	-	1/80	-	-	28	-	1/40	-	-
5	-	1/80	-	-	29	-	1/40	-	-
6	-	-	-	-	30	-	1/40	-	-
7	-	-	-	-	31	-	1/40	-	-
8	-	1/80	-	-	32	-	-	-	-
9	-	1/40	-	-	33	-	1/80	-	-
10	-	1/40	-	-	34	-	1/40	-	-
11	-	1/40	-	-	35	-	1/40	-	-
12	-	1/80	-	-	36	-	1/40	-	-
13	-	1/80	-	-	37	-	-	-	-
14	-	1/80	-	-	38	-	1/80	-	-
15	-	-	-	-	39	-	1/80	-	-
16	-	-	-	-	40	-	-	-	-
17	-	1/80	-	-	41	-	1/80	-	-
18	-	-	-	-	42	-	≥1/160	-	-
19	-	-	-	-	43	-	-	-	-
20	-	1/80	-	-	44	-	1/80	-	-
21	-	1/80	-	-	45	-	1/40	-	-
22	-	-	-	-	46	-	-	-	-
23	-	1/80	-	-	47	-	-	-	-
24	-	1/80	-	-					
Примечание: «-» соответствует титру антител <1/20									

Таким образом, исследования 289 образцов сывороток крови от людей, контактировавших с павшей или больной птицей, показали наличие антител к вирусам гриппа подтипов H5N1 и H5N8 в образцах из четырех регионов, в которых в 2016-2018 гг. были зарегистрированы вспышки. При этом, был выявлен довольно высокий процент положительных проб, что косвенно может указывать на то, что данные люди находятся в группе риска и, вероятно, имели контакт с вирусом гриппа. В ходе данного исследования нами не проводилась дополнительная оценка уровня антител, например в реакции нейтрализации, а

также не было выявлено РНК вируса гриппа среди образцов от людей за весь период исследования, поэтому нельзя говорить о том, происходило ли инфицирование людей во время вспышек, зарегистрированных в 2016-2018 гг. Тем не менее, полученные данные указывают на важность осуществления серологического мониторинга среди людей из групп риска для оценки возможности распространения высокопатогенных вариантов ВГП среди людей.

### **3.8 Характеристика исследованной выборки диких птиц**

Общепризнано, что дикие птицы являются основным резервуаром ВГП в природе. В связи с этим, мониторинг ВГП среди данной группы имеет самое важное значение при оценке механизмов и путей распространения вируса гриппа. При этом особое внимание необходимо уделять оценке видовой принадлежности диких птиц. Полученная информация позволит получить более полную картину циркуляции ВГП на территории России, а также оценить его дальнейшее распространение.

С 2013 по 2018 гг. на территории Российской Федерации был собран и обследован биологический материал от 15397 особей диких птиц. Основное количество особей составили птицы отряда гусеобразные, а также представители отрядов ржанкообразные и воробьинообразные. В процентном соотношении, количество особей птиц отряда гусеобразные составило 53,5%, соотношение представителей отрядов ржанкообразные и воробьинообразные составило 22,4% и 17,1% соответственно. На долю остальных 10 отрядов птиц пришлось 7% образцов. Видовой состав и количество обследованных особей представлены в таблице 39. Для трех вышеуказанных отрядов птиц было показано наибольшее разнообразие в исследованной выборке. Так, отряд гусеобразные в настоящем исследовании был представлен 28 различными видами птиц, также, как и отряд ржанкообразные. Отряд воробьинообразные был представлен 13 видами птиц. Остальные отряды, в основном, были представлены одним-двумя видами диких птиц.

Таблица 39 – Видовой состав и количество особей диких птиц, добытых в 2013-2018г. на территории Российской Федерации

Отряд	Вид	Количество по отрядам	количество по видам	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Гусеобразные ( <i>Anseriformes</i> )	Обыкновенный гоголь ( <i>Bucephala clangula</i> )	8243	137	39	45		10	5	38
	Серый гусь ( <i>Anser anser</i> )		334	71	20	87	48	31	77
	Белолобый гусь ( <i>Anser albifrons</i> )		199	45		44	19	53	38
	Гуменник ( <i>Anser fabalis</i> )		122	51			38	25	8
	Каменушка ( <i>Histrionicus histrionicus</i> )		70	13			57		
	Косатка ( <i>Mareca falcata</i> )		159	77	26			51	5
	Большой крохаль ( <i>Mergus merganser</i> )		263	49	52		57	71	34
	Средний крохаль ( <i>Mergus serrator</i> )		11	11					
	Кряква ( <i>Anas platyrhynchos</i> )		941	158	130	202	219	194	38
	Малый крохаль ( <i>Mergellus albellus</i> )		196	11		140		3	42
	Красноголовый нырок ( <i>Aythya ferina</i> )		470	175	52	52	119	41	31
	Свиязь ( <i>Mareca penelope</i> )		642	113	78	96	187	134	34
	Шилохвость ( <i>Anas acuta</i> )		499	62	159		111	110	57
	Огарь ( <i>Tadorna ferruginea</i> )		173	55			41		77
	Серая утка ( <i>Mareca strepera</i> )		882	204	181	210	176		111
	Хохлатая чернеть ( <i>Aythya fuligula</i> )		491	122	185		86	41	57
	Морская чернеть ( <i>Aythya marila</i> )		125	11			81	25	8
	Чирок-свистунок ( <i>Anas crecca</i> )		1152	238	252	79	235	115	233
	Чирок-трескунок ( <i>Spatula querquedula</i> )		753	162	244	44	114	36	153
	Широконоска ( <i>Spatula clypeata</i> )		440	97	155	17	133	23	15
	Лебедь-шипун ( <i>Cygnus olor</i> )		50			27		23	
	Красноносый нырок ( <i>Netta rufina</i> )		9			9			
	Морянка ( <i>Clangula hyemalis</i> )		13				13		
	Синьга ( <i>Melanitta nigra</i> )		26				3	15	8
Турпан ( <i>Melanitta fusca</i> )	19				19				
Мандаринка ( <i>Aix galericulata</i> )	17				13		4		
Чирок-клоктун ( <i>Sibirionetta formosa</i> )	45				22		23		
Малый гоголь ( <i>Bucephala albeola</i> )	5					5			
Ржанкообразные ( <i>Charadriiformes</i> )	Бекас ( <i>Gallinago gallinago</i> )	3452	102	11	10		35	38	8
	Обыкновенная крачка ( <i>Sterna hirundo</i> )		132	20	58		19		35
	Кулик-сорока ( <i>Haematopus ostralegus</i> )		124	53	20		51		
	Большой веретенник ( <i>Limosa limosa</i> )		91	18			48	25	

Таблица 39 – Видовой состав и количество особей диких птиц, добытых в 2013-2018г. на территории Российской Федерации

Отряд	Вид	Количество по отрядам	количество по видам	2013	2014	2015	2016	2017	2018	
	Малый веретенник ( <i>Limosa lapponica</i> )		4	4						
	Перевозчик ( <i>Actitis hypoleucos</i> )		258	22	32	79	79		46	
	Фифи ( <i>Tringa glareola</i> )		2	2						
	Серебристая чайка ( <i>Larus argentatus</i> )		684	51	128	147	152	38	168	
	Хохотунья ( <i>Larus cachinnans</i> )		233	33	37	9		97	57	
	Озёрная чайка ( <i>Chroicocephalus ridibundus</i> )		318	102	26	52	92		46	
	Буроголовая чайка ( <i>Chroicocephalus brunnicephalus</i> )		3	3						
	Чибис ( <i>Vanellus vanellus</i> )		169	20	78		63		8	
	Вальдшнеп ( <i>Scolopax rusticola</i> )		22				3	8	11	
	Травник ( <i>Tringa totanus</i> )		57				57			
	Монгольский зуёк ( <i>Charadrius mongolus</i> )		3				3			
	Песчанка ( <i>Calidris alba</i> )		3				3			
	Тулес ( <i>Pluvialis squatarola</i> )		19				19			
	Большой улит ( <i>Tringa nebularia</i> )		19				19			
	Пепельный улит ( <i>Tringa brevipes</i> )		3				3			
	Восточная клуша ( <i>Larus fuscus heuglini</i> )		213				22		191	
	Средиземноморская чайка ( <i>Larus michahellis</i> )		19				19			
	Тихоокеанская чайка ( <i>Larus schistisagus</i> )		746				296	271	179	
	Чернозобик ( <i>Calidris alpina</i> )		32				32			
	Камчатская крачка ( <i>Onychoprion aleuticus</i> )		18						18	
	Кулик-воробей ( <i>Calidris minuta</i> )		5						5	
Турухтан ( <i>Philomachus pugnax</i> )	5						5			
Сизая чайка ( <i>Larus canus</i> )	123						92	31		
Черныш ( <i>Tringa ochropus</i> )	45							45		
Воробьинообразные ( <i>Passeriformes</i> )	Ворон ( <i>Corvus corax</i> )	2639	125	18		70	16	13	8	
	Серая ворона ( <i>Corvus cornix</i> )		807	195	129	210	197	61	15	
	Галка ( <i>Coloeus monedula</i> )		64	2	21		41			
	Грач ( <i>Corvus frugilegus</i> )		1331	296	256	211	121	227	220	
	Дрозд-рябинник ( <i>Turdus pilaris</i> )		30	13			17			
	Обыкновенная сорока ( <i>Pica pica</i> )		120	13	67		32		8	
	Полевой воробей ( <i>Passer montanus</i> )		32				32			
	Чернозобый дрозд ( <i>Turdus atrogularis</i> )		10				10			
	Кедровка ( <i>Nucifraga caryocatactes</i> )		32				13	15	4	

Таблица 39 – Видовой состав и количество особей диких птиц, добытых в 2013-2018г. на территории Российской Федерации

Отряд	Вид	Количество по отрядам	количество по видам	2013	2014	2015	2016	2017	2018
	Обыкновенный поползень ( <i>Sitta europaea</i> )		16				16		
	Большая синица ( <i>Parus major</i> )		22				22		
	Обыкновенный скворец ( <i>Sturnus vulgaris</i> )		25				25		
	Белая трясогузка ( <i>Motacilla alba</i> )		25				25		
Гагарообразные ( <i>Gaviiformes</i> )	Чернозобая гагара ( <i>Gavia arctica</i> )	11	11	5			6		
Аистообразные ( <i>Ciconiiformes</i> )	Серая цапля ( <i>Ardea cinerea</i> )	36	31	7			19	5	
	Большая выпь ( <i>Botaurus stellaris</i> )		5					5	
Журавлеобразные ( <i>Gruiformes</i> )	Серый журавль ( <i>Grus grus</i> )	541	49	2		9	38		
	Лысуха ( <i>Fulica atra</i> )		492	44	157	101	179	3	8
Поганкообразные ( <i>Podicipediformes</i> )	Большая поганка ( <i>Podiceps cristatus</i> )	127	127	35			92		
Олушеобразные ( <i>Suliformes</i> )	Большой баклан ( <i>Phalacrocorax carbo</i> )	97	67	15		25	16	3	8
	Малый баклан ( <i>Phalacrocorax pygmeus</i> )		30			30			
Ястребообразные ( <i>Accipitriformes</i> )	Чёрный коршун ( <i>Milvus migrans</i> )	35	32		29			3	
	Ястреб-тетеревятник ( <i>Accipiter gentilis</i> )		3				3		
Соколообразные ( <i>Falconiformes</i> )	Обыкновенная пустельга ( <i>Falco tinnunculus</i> )	3	3				3		
Курообразные ( <i>Galliformes</i> )	Тетерев ( <i>Lyrurus tetrix</i> )	143	61				31	30	
	Рябчик ( <i>Bonasa bonasia</i> )		63				63		
	Серая куропатка ( <i>Perdix perdix</i> )		19				19		
Голубеобразные ( <i>Columbiformes</i> )	Сизый голубь ( <i>Columba livia</i> )	67	46				33	13	
	Большая горлица ( <i>Streptopelia orientalis</i> )		21				10		11
Совообразные ( <i>Strigiformes</i> )	Ушастая сова ( <i>Asio otus</i> )	3	2					2	
	Длиннохвостая неясыть ( <i>Strix uralensis</i> )		1					1	
<b>13 отрядов</b>	<b>87 видов</b>		<b>15397</b>	<b>2748</b>	<b>2627</b>	<b>1950</b>	<b>3895</b>	<b>1979</b>	<b>2198</b>

**Отряд гусеобразные** в данном исследовании был представлен широко распространенными на территории Российской Федерации видами диких уток, таких как чирок-свистунок (n=1152), чирок-трескунок (n=753), кряква (n=941), серая утка (n=882), свиязь (n=642) и др., а также несколькими видами диких гусей. Эти виды птиц гнездятся на территориях большинства регионов России и добывались, в основном, на протяжении всех лет проведения данного исследования. В то же время, среди отряда гусеобразные были и такие виды, как малый гоголь, морянка и средний крохаль, которые встречались только в определенные годы и в небольшом количестве. Выборка данных видов птиц не является репрезентативной. Однако эти виды входят в общее число особей гусеобразных. Возможное нахождение ВГА у данных видов явилось бы важным фактом для установления круга его хозяев.

**Отряд ржанкообразные** в исследовании был представлен 28 различными видами диких птиц, из которых наибольшее число было представлено двумя семействами – чайковые (*Laridae*), на долю которых пришлось 72,1% исследованных особей, и бекасовые (*Scolopacidae*), представители которых составили 18,8% от общего числа. Наибольшее количество проб было взято от таких видов как тихоокеанская чайка (n=746), серебристая чайка (n=684), озерная чайка (n=318), а также от нескольких видов куликов, таких как перевозчик (n=258), бекас (n=102), кулик-сорока (n=124). Вышеупомянутые виды тоже широко распространены на территории России и встречались в нашем исследовании практически ежегодно. В то же время, в исследованном отряде птиц значительное количество видов встречалось только в одном году и в небольшом количестве. Так, например, за весь период наблюдения было исследовано только 2 особи фифи, 3 особи буроголовой чайки и 4 особи малого веретенника, которые были добыты в 2013 году. По три особи монгольского зуйка, пепельного улита и песчанки были добыты в 2016 году.

**Отряд воробьинообразные** в данном исследовании был представлен 13 видами диких птиц. При этом, основное количество (81%) птиц составили

представители двух видов – грач и серая ворона, которые добывались ежегодно в значительном количестве. Представители других видов встречались в основном в 2016 году, но также были представлены широко распространенными на территории России видами, включая синантропных птиц, как например, обыкновенная сорока, которая, зачастую обитает вблизи человека, в связи с чем имеет важное эпидемиологическое значение в аспекте распространения ВГП.

Как уже говорилось ранее, доля представителей остальных отрядов в исследованной выборке составила 7% от общего числа птиц. В основном, каждый отряд был представлен 2-3 видами диких птиц, количество особей которых было небольшим. Однако, в **отряде журавлеобразные**, который был представлен двумя видами, был собран биоматериал от 492 особей лысухи, которая является широко распространенным видом на территории России и добывалась в наших исследованиях ежегодно.

**Отряд ястребообразные** был представлен двумя видами птиц и включал только три особи ястреба-тетеревятника, добытых в 2016 году. **Отряд соколообразные** был представлен тремя особями обыкновенной пустельги. Тем не менее исследование данных таксономических групп хищных птиц является важным при оценке круга хозяев ВГП. Так, например, исследование 3 птиц двух видов из **отряда совообразные** показало их восприимчивость к высокопатогенному вирусу гриппа подтипа H5N8. Биоматериал от этих птиц был собран во время вспышки на территории Воронежского зоопарка.

За весь период исследования от диких птиц было выделено 48 штаммов вируса гриппа (табл. 40). При этом, основное количество вирусов было получено от птиц, принадлежащих отряду гусеобразные. От представителей данной таксономической группы было выделено 25 штаммов. Помимо наибольшего количества штаммов, среди отряда гусеобразные в нашем исследовании было показано наибольшее разнообразие вариантов ВГП. От птиц этого отряда были выделены вирусы гриппа подтипов H3N6, H3N8, H4N6, H5N1, H5N8 H10N6, H6N1, H9N2, H10N7, H13N6, H13N8. От птиц

отряда ржанкообразные было выделено 11 штаммов ВГП, которые были представлены вирусами подтипа H5N5, H5N6, H5N8, а также 4 штамма вирусов гриппа подтипов H13N6 (n=1) и H13N8 (n=3), выделенных от чаек. От 5 грачей, которые относятся к отряду воробьинообразные, было выделено 5 штаммов ВГП, которые включали 4 высокопатогенных варианта ВГП подтипа H5N1, а также один непатогенный вариант вируса гриппа H3N8. Вирус гриппа подтипа H5N1 также был выделен от серого журавля из отряда журавлеобразные в ходе мониторинга 2015 году на территории Новосибирской области. От птиц, принадлежащих трем оставшимся отрядам (совообразные, аистообразные и поганкообразные) были выделены вирусы гриппа подтипа H5N8. Данный подтип регистрировался во время массовой эпизоотии на территории России в 2016-2019 гг.

Таблица 40. Вирусы гриппа, выявленные среди диких птиц в ходе мониторинга в 2013-2018гг.

№ пп	Год выделения	Регион выделения	Штамм	Вид птицы
1	2013	Новосибирская область	Вирус не выделен	Серая утка
2		Новосибирская область	Вирус не выделен	Серая утка
3	2014	Хабаровский край	A/mallard/Khabarovsk/12/2014 (H10N7)	Кряква
4		Новосибирская область	A/duck/Chany/616/2014 (H3N8)	Серая утка
5		Новосибирская область	A/rook/Chany/606/2014 (H3N8)	Грач
6		Республика Саха (Якутия)	A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8)	Связь
7		Хабаровский край	A/gull/Khabarovsk/7/2014 (H13N6)	Серебристая чайка
8	2015	Новосибирская область	A/mallard/Chany/31/2015 (H5N1)	Кряква
9		Новосибирская область	A/rook/Chany/32/2015 (H5N1)	Грач
10		Новосибирская область	A/rook/Chany/33/2015 (H5N1)	Грач
11		Новосибирская область	A/crane/Chany/34/2015 (H5N1)	Серый журавль
12		Новосибирская область	A/duck/Chany/35/2015 (H5N1)	Серая утка
13		Новосибирская область	A/rook/Sartlan/42/2015 (H5N1)	Грач
14		Новосибирская область	A/rook/Dovolnoe/50/2015 (H5N1)	Грач
15	2016	Республика Тыва	A/black-headed gull/Tyva/41/2016 (H5N8)	Озерная чайка
16		Республика Тыва	A/wild duck/Tyva/35/2016 (H5N8)	Красноголовый нырок
17		Республика Тыва	A/great crested grebe/Tyva/34/2016 (H5N8)	Большая поганка
18		Республика Тыва	A/grey heron/Tyva/20/2016 (H5N8)	Серая цапля
19		Республика Тыва	A/grey heron/Tyva/33/2016 (H5N8)	Серая цапля
20		Камчатский край	A/environment/Kamchatka/23/2016 (H13N6)	Тихоокеанская чайка

21		Камчатский край	A/environment/Kamchatka/24/2016 (H13N6)	Тихоокеанская чайка
22		Новосибирская область	A/mallard/Toguchin/1154/2016 (H6N1)	Кряква
23		Новосибирская область	A/teal/Toguchin/1157/2016 (H6N1)	Чирок-свиистунок
24		Новосибирская область	A/teal/Toguchin/1156/2016 (H6N1)	Чирок-свиистунок
25		Новосибирская область	A/teal/Toguchin/1153/2016 (H6N1)	Чирок-свиистунок
26		Камчатский край	A/environment/Kamchatka/117/2016 (H13N8)	Тихоокеанская чайка
27		Камчатский край	A/environment/Kamchatka/18/2016 (H5N5)	Тихоокеанская чайка
28		Курганская область	A/gadwall/Kurgan/2442/2016 (H5N8)	Серая утка
29		Алтайский край	A/garganey/Altai/2092/2016 (H5N8)	Чирок-трескунок
30		Республика Татарстан	A/wild duck/Tatarstan/3059/2016 (H5N8)	Красноголовый нырок
31	2017	Калининградская область	A/mute swan/Kaliningrad/132/2017 (H5N8)	Лебедь-шипун
32		Краснодарский край	A/mute swan/Krasnodar/25/2017 (H5N8)	Лебедь-шипун
33		Воронежская область	A/long-eared owl/Voronezh/15/2017 (H5N8)	Ушастая сова
34		Воронежская область	A/long-eared owl/Voronezh/16/2017 (H5N8)	Ушастая сова
35		Воронежская область	A/Ural owl/Voronezh/14/2017 (H5N8)	Длиннохвостая неясыть
36		Хабаровский край	A/mallard/Khabarovsk/241/2017 (H10N6)	Кряква
37		Новосибирская область	A/mallard/Toguchin/19/2017 (H4N6)	Кряква
38		Новосибирская область	A/mallard/Toguchin/13/2017 (H4N6)	Кряква
39	2018	Саратовская область	A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6)	Сизая чайка
40		Новосибирская область	A/common teal/Chany/893/2018 (H3N6)	Чирок-свиистунок
41		Новосибирская область	A/common teal/Chany/892/2018 (H3N6)	Чирок-свиистунок
42		Новосибирская область	A/common teal/Chany/891/2018 (H3N6)	Чирок-свиистунок
43		Новосибирская область	A/common teal/Chany/889/2018 (H3N6)	Чирок-свиистунок
44		Томская область	A/mallard/Tomsk/1391/2018 (H9N2)	Кряква
45		Курганская область	A/green sandpiper/Kurgan/1050/2018 (H3N8)	Черныш
46		Курганская область	A/green sandpiper/Kurgan/1048/2018 (H3N8)	Черныш
47		Курганская область	A/green sandpiper/Kurgan/1046/2018 (H3N8)	Черныш
48		Курганская область	A/green sandpiper/Kurgan/1043/2018 (H3N8)	Черныш

Следует особо отметить, что в ходе мониторинга вируса гриппа среди диких птиц из года в год наблюдалась положительная динамика в плане вирусывыделения, как при расчете процентного соотношения, так и в фактически выделенных штаммах вируса гриппа А. В целом, процент выделения ВГП от диких птиц за все время исследований составил 0,31%. При этом из года в год данный процент менялся от 0.07% и 0.19% в 2013г. и 2014г.

соответственно, до 0.46% в 2018 году, что является максимальным показателем вирусовыделения за год исследования.

Если говорить о проценте выделения ВГП от диких птиц по отрядам, то данный показатель для птиц отряда гусеобразные составил 0,3% как и для представителей отряда ржанкообразные (0,32%). Для птиц отряда воробьинообразные процент выделения ВГП составил 0.19%. Для представителей других отрядов выборка птиц не являлась репрезентативной, в связи с чем процент выделения не может быть рассчитан.

Если провести оценку роли отдельных видов диких птиц, участвовавших в циркуляции вирусов, то среди семи видов отряда гусеобразные, от которых были выделены вирусы гриппа, наибольшие показатели были отмечены среди таких видов как кряква, серая утка и чирок-свистунок. Процент выделения вируса от этих видов из общего количества исследованных проб составил 0,74, 0,57 и 0,61 соответственно (табл. 41). При этом, 4% выделения вируса гриппа из проб, взятых от вида лебедь-шипун, нельзя считать достоверными, так как выборка данного вида не является репрезентативной при 50 исследованных особях, что составляет 0,32% от общего количества исследованных птиц.

Схожая картина наблюдается среди птиц отряда ржанкообразные. Из 5 видов отряда, от которых были выделены вирусы гриппа, наибольший процент выделения был отмечен среди таких видов как озерная чайка, сизая чайка и тихоокеанская чайка, тогда как 8,88% выделения вируса гриппа из проб, взятых от вида черныш, также нельзя считать достоверным при выборке данного вида в 50 особей, что составляет 0,29% от общего количества исследованных птиц. Также, вероятно, нельзя считать достоверным процент выделения вируса от представителей отрядов аистообразные, журавлеобразные и совообразные.

Таким образом, результаты исследований согласуются с описанными в литературе данными о роли конкретных отрядов и видов диких птиц в циркуляции вируса гриппа в природе.

Таблица 41. Количественная характеристика видов птиц, от которых выделены вирусы гриппа.

Отряд	Вид птицы	Кол-во особей	% от общего кол-ва исследованных птиц	Кол-во особей, от которых выделен вирус	% выделения вируса гриппа А						
					по отряду	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Гусеобразные	Красноголовый нырок	470	3,05	2	0,43	-	-	-	1,68	-	-
	Кряква	941	6,11	7	0,74	-	0,77	0,5	0,46	1,55	2,63
	Лебедь-шипун	50	0,32	2	4	-	-	-	-	8,7	-
	Связь	642	4,17	1	0,16	-	1,28	-	-	-	-
	Серая утка	882	5,73	5	0,57	0,98	0,55	0,48	0,57	-	-
	Чирок-свиистунок	1152	7,48	7	0,61	-	-	-	1,28	-	1,72
	Чирок-трескунок	753	4,89	1	0,13	-	-	-	0,88	-	-
Ржанкообразные	Озерная чайка	318	2,07	1	0,32	-	-	-	1,09	-	-
	Серебристая чайка	684	4,44	1	0,15	-	0,78	-	-	-	-
	Сизая чайка	123	0,80	1	0,81	-	-	-	-	-	3,23
	Тихоокеанская чайка	746	4,85	4	0,54	-	-	-	1,35	-	-
	Черныш	45	0,29	4	8,88	-	-	-	-	-	8,88
Воробьинообразные	Грач	1331	8,64	5	0,38	-	0,39	1,9	-	-	-
Аистообразные	Серая цапля	31	0,20	2	6,45	-	-	-	10,53	-	-
Журавлеобразные	Серый журавль	49	0,32	1	2,04	-	-	-	22,22	-	-
Поганкообразные	Большая поганка	127	0,82	1	0,79	-	-	-	1,09	-	-
Совообразные	Ушастая сова	2	0,01	2	100	-	-	-	-	100	-
	Длиннохвостая неясыть	1	0,01	1	100	-	-	-	-	100	-

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проблема распространения высокопатогенных вирусов гриппа птиц не теряет своей актуальности. С момента своего появления данные варианты вируса распространились по многим странам и континентам, вызывая вспышки среди сельскохозяйственных животных, а также случаи заболевания и гибели людей. Эта проблема не обходит стороной и территорию Российской Федерации. За последние годы в Европейской части России были зафиксированы десятки вспышек, в результате которых был нанесен существенный экономический ущерб. Наиболее серьезный урон понесли птицефабрики и частные подворья республики Калмыкия, Астраханской, Ростовской и Московской областей в 2016-2018 гг. В результате этой масштабной эпизоотии погибли от инфекции или были забиты миллионы голов сельскохозяйственной птицы. Также, в Воронежском зоопарке им. А.С. Попова в 2017 году в результате инфекции погибла редкая коллекция диких птиц различных видов, часть из которых занесена в Международную Красную Книгу. Как было показано, данная эпизоотия была вызвана высокопатогенным вирусом гриппа H5N8, который был, вероятно, занесен на территорию России из Юго-Восточной Азии весной 2016 года с дикими птицами, являющимися основным природным резервуаром вируса гриппа. Надо отметить, что через территорию Российской Федерации проходят три основных миграционных маршрута диких птиц – Восточно-Азиатско-Австралийский и Центрально-Азиатский пролетные пути, которые связывают территорию Сибири и Дальнего Востока России со странами Юго-восточной Азии, а также Черноморско-Средиземноморский пролетный путь, который связывает европейскую часть России с европейскими странами и африканским континентом (S.J. Lycett et al., 2019). Такая связь с эндемичными очагами высокопатогенных вирусов гриппа представляет ежегодную угрозу заноса вируса на территорию России во время весенних миграций диких птиц и возникновения новых вспышек гриппа. При этом сохраняется риск заражения

человека высокопатогенными вирусами. Тем не менее, вирус гриппа перелетных водоплавающих птиц до сих пор не способен непосредственно инфицировать человека, однако, способен инфицировать кур, свиней или тюленей, которые уже могут служить резервуаром высокопатогенного вируса гриппа, способного инфицировать человека. Хотя, в России до сих пор не было зафиксировано ни одного случая заражения людей вирусами H5, H7 или H9-подтипов, определенные группы населения, такие как работники птицефабрик и свиноферм, люди, содержащие домашнюю птицу, охотники, то есть все, кто по роду своей деятельности контактируют с дикой или домашней птицей и животными, относятся к группам риска по заражению высокопатогенным гриппом, так как на сегодняшний день основным путем заражения человека является непосредственный контакт с больной или погибшей птицей или животным.

Таким образом, становится очевидной необходимость поиска основных путей решения важной научной проблемы распространения вируса гриппа. Одной из ключевых мер по контролю данного возбудителя является комплексный мониторинг высокопатогенного вируса гриппа, который включает не только выявление циркулирующих среди птиц и животных вариантов ВГА и углубленное изучение основных биологических свойств, определяющих пандемический потенциал выделенных штаммов, но также оценку популяционного иммунитета населения из групп риска к различным вариантам высокопатогенного вируса гриппа. Полученные в ходе такой работы данные позволяют определить ключевые факторы, влияющие на пандемический потенциал циркулирующих вариантов вируса гриппа, а также оценивать степень угрозы распространения этих вариантов среди людей и дальнейшие пути распространения данной зоонозной инфекции.

В рамках новой системы мониторинга с 2013 по 2018 год совместно с региональными учреждениями Роспотребнадзора было собрано и обследовано почти 50000 образцов биоматериала от птиц и млекопитающих, включая человека. При этом, если в 2013 году собранный материал был представлен

только пробами от диких птиц и незначительным количеством проб от домашних, то со временем было увеличено количество исследуемого материала от домашних птиц, а с 2015 года стал осуществляться сбор материала от свиней, морских млекопитающих и людей. В среднем, описываемая система мониторинга вируса гриппа птиц позволила ежегодно проводить сбор около 3500 образцов от диких птиц, 2500 проб от людей и домашней птицы, а также около 400 проб от свиней. Сбор биоматериала от морских млекопитающих осуществлялся только в 2015 и 2016 годах, после чего временно прекратился ввиду определенных сложностей при отлове животных и отборе проб. Всего было собрано 82 пробы от таких видов как морской заяц (*Erignathus barbatus*) и ларга (*Phoca largha*). В целом, количество собираемого материала является значительным и вполне достаточным для осуществления мониторинга ВГП, однако наши результаты указывают на то, что на некоторых территориях все же сбор осуществлялся нерегулярно и порой в недостаточном количестве. Однако это говорит только о том, что представленная система является эффективной в плане сбора биологического материала от животных и людей, но требует небольшого совершенствования.

С момента формирования новой системы мониторинга, в соответствии с регламентирующими документами, мониторинг должен был осуществляться ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и 37 региональными Центрами гигиены и эпидемиологии. Таким образом, сбор и анализ материала проходил бы на значительной территории Российской Федерации. Тем не менее, за время работы, ни разу мониторинг ВГП не был осуществлен на территории всех регионов одновременно. С 2013 по 2015 годы сбор материала осуществлялся на территориях 18, 26 и 22 регионов соответственно. При этом, в эти годы значительная часть собранного биоматериала из региональных лабораторий для исследования направлялась непосредственно в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Порой, длительная транспортировка способствовала размораживанию проб и ухудшению качества материала. Об

этом свидетельствует невысокий процент выделения ВГА. Так, в 2013 году выделить вирус не удалось, хотя РНК была выявлена в трех образцах.

В 2016 году, в целях совершенствования мониторинга вируса гриппа птиц, данная система мониторинга была модернизирована созданием трех опорных баз, которыми являются Управление Роспотребнадзора по Хабаровскому краю, Новосибирской области и Краснодарскому краю. В рамках дополнительного приказа Руководителя Роспотребнадзора от 04.08.2016 №842 «Об организации опорных баз по мониторингу за вирусом гриппа с пандемическим потенциалом» первичная диагностика биоматериала от птиц и других животных осуществлялась в региональном ЦГиЭ. В случае выявления положительных образцов, их направляли в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Работа региональных лабораторий в этом направлении контролировалась Опорными базами. При этом, количество регионов Российской Федерации, участвующих в мониторинге ВГП, увеличилось до 48. Несомненно, данная мера способствовала увеличению количества и качества сбора биоматериала и его анализа, а также качеству транспортировки. К 2018 году количество регионов, в которых осуществлялся мониторинг ВГП, достигло 43.

Сравнимые по масштабу мониторинговые работы осуществлялись в НИИ вирусологии им.Д.И.Ивановского. С 1979 по 2002 гг. сбор и анализ биоматериала осуществлялся на территориях Центральной России, Сибири и Дальнего Востока. При этом, ежегодно из каждого региона обследовали 200-250 проб от 50-100 птиц (Д.К. Львов с соавт., 2004). Тем не менее, в опубликованных данных отсутствует информация о том, в скольких регионах в целом осуществлялся мониторинг вируса гриппа птиц. Однако нет сомнений в том, что в данных исследованиях регулярно осуществлялся мониторинг в ключевых точках распространения вируса гриппа птиц.

В последующие годы мониторинг вируса гриппа птиц ежегодно осуществлялся ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, однако регулярно исследования проводились, в основном, на территории западной части

Новосибирской области, республиках Тыва и Хакассия и в Приморском крае (М.А. De Marco et al., 2016). С 2009 года ФГБУ «ВНИИЗЖ» на регулярной основе осуществляет мониторинг вируса гриппа птиц на территории республики Тыва (М.С. Волков с соавт., 2016), а также на территории республики Крым (Д. В. Гадзевич с соавт., 2019).

Таким образом, удалось достичь охвата значительной территории Российской Федерации, на которой систематически, в течение нескольких лет осуществлялся мониторинг вируса гриппа птиц. В течение как минимум пяти из шести лет исследуемого периода сбор биоматериала от животных и людей для исследования на наличие вируса гриппа осуществлялся на территории 21 региона Европейской части России, западной и центральной Сибири, а также Дальнего Востока.

Эффективность любой системы мониторинга ВГП зависит от множества факторов, начиная от методологии сбора биоматериала, условий его транспортировки и заканчивая качественно проведенным анализом, интерпретацией полученных результатов и принятием соответствующих ответных мер. Если говорить о мониторинге вируса гриппа среди диких птиц, то в описываемой системе мониторинга становятся очевидными как ее сильные стороны, так и некоторые моменты, которые требуют особого внимания и совершенствования.

Так, в наших исследованиях с 2013 по 2018 год был собран и обследован биоматериал от более чем 20 тысяч особей диких птиц из которых 15397 были определены до вида. Исследованная выборка диких птиц насчитывала 87 различных видов, относящихся к 13 отрядам. При этом наибольшее количество проб было собрано от птиц отряда гусеобразные (53,5%), и ржанкообразные (22,4%). Множество исследований показывают, что птицы, которые относятся к данным отрядам, являются основными хозяевами и природным резервуаром ВГА. Также более 17% проб было собрано от птиц отряда воробьинообразные. Эта таксономическая группа является крайне важной в эпидемиологическом значении, так как ее представители, зачастую,

являются синантропными видами, образ жизни которых связан с деятельностью человека и нередко включает тесные контакты с людьми. Таким образом, в рамках данной системы мониторинга сбор биологического материала осуществлялся в соответствии с общемировым трендом в исследовании ВГП и дополнил общую картину циркуляции вируса в природе, а также некоторые эколого-географические аспекты его распространения.

Наши исследования показали, что в циркуляцию вируса гриппа вовлечены различные виды диких птиц. В основном, это птицы отряда гусеобразные и ржанкообразные, что в очередной раз подтверждает их ключевую роль в распространении вируса как основных хозяев (Д.К. Львов с соавт., 2004; D.J. Alexander, 2000; D.L. Suarez, 2000). Также отмечено носительство гриппа у воробьинообразных птиц, в основном экологически не связанных с водоемами.

Большинство видов птиц, от которых нами был выделен вирус гриппа, являются мигрирующими на значительные расстояния Евразии. Так, например серая утка мигрирует в прибрежные области Средиземного и Черного морей, Восточную Африку, на побережье Каспия, в Иран и Индию. Восточные популяции мигрируют на восток и юго-восток, достигая территорий Юго-Восточной Азии, Японских островов (A.S. Derek, 1996). Область гнездования различных популяций чирка-свистунка обширна, захватывает почти всю Западную Европу и большую часть Средней Азии до северного Ирана, Северо-Западной Монголии и Маньчжурии, включает северную половину Японских островов и западную часть Северной Америки до Великих озер. Зимует чирок-свистунок в Западной Европе, Средиземноморье, на юге Азии (J. Veen et al., 2005). Вышеизложенные данные о миграциях предполагают высокую вероятность участия этих видов-хозяев в эпизоотическом процессе на различных отдаленных территориях, возможной реассортации различных вариантов вируса гриппа в ареалах обитания многих популяций.

В наших исследованиях выделен ряд штаммов, относящихся к различным подтипам как низкопатогенных (H3N6, H3N8, H4N6, H10N6, H13N6 и т.д.), так и высокопатогенных вариантов ВГП (H5N1, H5N2, H5N5, H5N6, H5N8). Ранее было показано, что вирусы гриппа птиц H3N8 и H3N6-подтипов, подобные выделенным в нашей работе вариантам, широко распространены в популяциях диких птиц Евразии и Америки. Подавляющее большинство видов-хозяев данных подтипов принадлежит отряду гусеобразные (D.J.Alexander, 2000). Полученные нами результаты дополняют современную картину распространения этих подтипов в Евразии. Следует отметить, что по имеющимся данным среди штаммов вируса гриппа H3-подтипа гемагглютинина не было выявлено высокопатогенных для птиц вариантов. Однако, описаны варианты H3N8, которые адаптированы к млекопитающим. В частности, некоторые из них вызывают эпизоотии гриппа лошадей, с последующей передачей собакам (P.D. Kirkland et al.2010).

Вирус гриппа H10-подтипа гемагглютинина распространен в меньшей степени. Ранее он был выделен на Североамериканском континенте, в Египте, Германии, Иране, Японии и Корее (данные GISAID). Наши исследования подтверждают присутствие этого подтипа в популяциях птиц, обитающих на территории России, и дополняют общую картину циркуляции ВГП. Также, распространение различных вариантов ВГП на территории России дополняются выделенными штаммами H13N6 и H13N8. Следует отметить, что вирус гриппа H13-подтипа в основном распространен у представителей семейства чайковых (*Laridae*), что и было показано в настоящем исследовании. Данный подтип HА обычно образует отдельные филогенетические линии, выявляемые в различных географических регионах. Так, относительно недавно, в ходе изучения штаммов H13N9-подтипа, выделенных от доминиканских чаек (*Larus dominicanus*) в Аргентине, была обнаружена отдельная, независимая филогенетическая линия вирусов гриппа чаек Южной Америки (A.J. Pereda et al., 2008).

Часть вирусов, изолированных от чаек, обладает потенциальной способностью инфицировать уток. Между тем, подтипы, распространенные среди уток, редко встречаются либо вообще отсутствуют среди чаек (Y. Kawaoka et al., 1988). Вирусы гриппа H13N2 и H13N9 в свое время были изолированы и от китов - обыкновенной гринды (*Globicephala melaena*) (V.S.Hinshaw et al.,1986). Оказалось, что гемагглютинин H13 вируса гриппа китов аналогичен гемагглютинину ВГА чаек; это подтверждает гипотезу, что вирусы гриппа птиц могут проникать в популяции морских животных, но, вероятно, их циркуляция не поддерживается постоянно (Т.М. Chambers et al., 1989). В литературе существует множество документированных фактов выделения вирусов гриппа А от чайковых, тем не менее, выделенные в данной работе вирусы также могут иметь важное эпидемиологическое и эпизоотологическое значение при углубленном изучении их эпидемического потенциала.

Вирусы гриппа птиц подтипов H3, H4, H10 и H13, как уже говорилось, широко распространены в природе, и циркуляция данных вариантов регулярно отмечается в различных регионах мира, в том числе в России. На территории Российской Федерации вирусы вышеуказанных подтипов выделяли в различные годы проведения мониторинга. Так, еще в 1963 году на территории Украины был выделен вирус гриппа подтипа H3N8. С конца 1970-х годов на территории бывшего СССР регулярно выделяли вирусы гриппа подтипов H4N6 и H13N6. Вирусы гриппа H4 активно циркулировали и выявлялись в различных комбинациях, таких как H4N2, H4N6, H4N8 и H4N9, при этом, вирусы выделялись не только от птиц. В 2000 году вирус гриппа H4N6 был выделен от ондатры (Д.К. Львов с соавт., 2004). С начала 2000-х годов, когда мониторинг вируса гриппа осуществлялся ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, вышеуказанные варианты вируса гриппа птиц также выделялись в различные годы на разных территориях. Так, на Дальнем Востоке России в период 2007-2012 была отмечена циркуляция вирусов H4N6, H4N8, H10N6 и H10N8. На

территории Западной Сибири (Новосибирская область) в этот же период циркулировали вирусы гриппа подтипа H13 (M.A. De Marco et al., 2016).

Надо сказать, что особую важность и несомненную эффективность система мониторинга Роспотребнадзора показала при раннем выявлении особо важных в эпидемиологическом и эпизоотологическом значении вариантов ВГП, к которым, в первую очередь стоит отнести высокопатогенные вирусы гриппа подтипа H5.

Если говорить о вирусах H5 подтипа в целом, то на территории России вирусы H5 до их глобального распространения регистрировались на территории Алтайского края и Приморского края в 1991 и 2001 годах соответственно. В то время были выделены непатогенные вирусы гриппа H5N2 и H5N3 (Д.К. Львов с соавт., 2004). Высокопатогенный вариант вируса гриппа H5N1 был занесен на территорию России в 2005 году. С 2005 по 2007 года в России циркулировали представители клады 2.2, с 2008 года вспышки среди диких и домашних птиц в России были вызваны вирусами H5N1 клады 2.3.2 (M.A. De Marco et al., 2016; К.А. Шаршов с соавт., 2014), циркулировавшими до появления и распространения нового варианта вируса гриппа – H5N8.

В октябре 2014 года на территории республики Саха (Якутия) нами был впервые в России выявлен высокопатогенный вирус гриппа подтипа H5N8 новой в то время генетической клады 2.3.4.4. Ранее данный подтип вируса и представители данной клады в России не регистрировались.

Следует отметить, что территория Республики Саха (Якутия) является регионом, играющим важную роль в экологии вируса гриппа. Данный регион располагается на пересечении нескольких пролетных путей диких птиц. На территории республики обитает более 300 видов диких птиц, из которых около 220 являются мигрирующими (M.V. Vladimirtseva, N.I. Germogonov, 2013). Это указывает на широкие территориальные связи различных видов птиц, в частности, водоплавающих, которые являются основным резервуаром ВГП (R.G. Webster et al., 1992). Выделение высокопатогенного штамма

A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) в России, очевидно, указывает на его распространение мигрирующими дикими птицами из Юго-Восточной Азии. Об этом свидетельствуют данные филогенетического анализа, хронология и характер вспышек высокопатогенного вируса H5N8. Так, В начале 2014 года были зафиксированы вспышки среди домашних и диких птиц на территории Южной Кореи, Китая и Японии (S. Fan et al., 2014; J. Jeong et al., 2014; K.B. Ku et al., 2014; Y.J. Lee et al., 2014). Был выделен и описан ряд штаммов H5N8, которые представляли собой новый реассортант трех подтипов: A(H4N2) (A/duck/Hunan/8-19/2009), A(H5N8) (A/duck/Jiangsu/k1203/2010 и A(H11N9) (A/environment/Jiangxi/28/2009). В Европе, с ноября 2014 года, высокопатогенный вирус гриппа H5N8 поразил фермы домашней птицы на территории Германии, Венгрии, Италии, в Нидерландах и Англии (OIE, 2015). Исследования показали, что предположительно, после первой вспышки в январе 2014 года в Южной Корее вирус распространился в Европейские страны перелетными птицами, используя приполярный путь миграции через Российское побережье Северного Ледовитого океана. Это подтверждается выделением штамма данного подтипа вируса от нескольких видов диких птиц (C. Alldoch et al., 2014; J.H. Verhagen et al., 2014). Распространение вируса дикими птицами показано выделением вируса гриппа H5N8-подтипа на территории Канады и США. Эта гипотеза также подтверждается исследованиями Verhagen J.H. с соавт. и Ip H.S. с соавт. (H.S. Ip et al., 2015; J.H. Verhagen et al., 2014; J.H. Verhagen et al., 2015).

Вспышки высокопатогенного вируса гриппа птиц на территории России регистрируются с 2005 года (К.А. Sharshov et al., 2010), однако, не все они имели массовый характер. Появление и распространение нового вируса гриппа H5N8-подтипа поставило мировое сообщество перед вопросом о возникновении нового подтипа вируса гриппа с пандемическим потенциалом. Анализируя продолжающиеся в 2015 году вспышки ВГП подтипа H5N8 на территории Юго-Восточной Азии и Европы, нами было высказано предположение о возможном повторном выделении вируса гриппа H5N8 в

некоторых регионах России (В.Ю. Марченко с соавт., 2015). Наша гипотеза получила подтверждение, когда в мае 2016 года вирус H5N8 появился на территории Республики Тыва.

В 2015 году вируса гриппа H5N8 на территории России выявлено не было, однако, в ходе мониторинга вируса гриппа нами была зафиксирована циркуляция вируса гриппа подтипа H5N1. В мае 2015 г. от диких птиц, включая несколько клинически здоровых грачей (*Corvus frugilegus*), добытых на территории трех районов Новосибирской области, нами было выделено семь штаммов вируса гриппа H5N1 клады 2.3.2.1с.

Результаты наших исследований показали, что на территории России весной 2015г. циркулировал высокопатогенный вариант вируса гриппа H5N1, возможно, обладающий пандемическим потенциалом. Его высокая вирулентность для мышей, вероятность повышенного взаимодействия с  $\alpha$ 2-6 сиаловыми кислотами представляли угрозу проникновения вируса в популяции млекопитающих, включая человека. На эту возможность указывали документированные случаи заражения вирусом H5N1 клады 2.3.2.1 человека в Канаде и тигра в одном из Китайских зоопарков (K. Rabbaraju et al., 2014; S. He et al., 2015). Данные вирусы имели высокую степень родства с выделенными нами штаммами.

Особо следует отметить значение территории Западной Сибири в экологии вируса гриппа птиц. На территории Новосибирской области расположено огромное количество рек и озер, находящихся на путях миграции многих видов птиц и являющихся гнездовыми ареалами большого числа видов, экологически связанных с водоемами. Территориальные связи западносибирских птиц, формирующиеся в процессе сезонных миграций, весьма обширны. На юге Западной Сибири сходятся миграционные потоки птиц, зимующих в различных регионах мира – Европе, Африке, на Ближнем Востоке и в Средней Азии, Индостане и Юго-Восточной Азии. Таким образом, юг Западной Сибири представляет собой территорию, на которой гнездятся и

останавливаются во время перелетов миллионы птиц (К.Т. Юрлов, 1981). Территорию юга Западной Сибири пересекают три перелетных пути, основным из которых является Центрально-Азиатский. Неслучайно, что большое количество штаммов ВГА выделено из биоматериала, собранного на территориях таких озер как Чаны, Сартлан и др., находящихся в Новосибирской области.

В 2019-2020 годах крупных вспышек высокопатогенного вируса гриппа H5N1, а также случаев заражения человека на территории России отмечено не было, но возможность их возникновения сохраняется. При анализе полученной нами информации можно сделать предположение, что вирусы гриппа клады 2.3.2.1 распространяются в обоих направлениях между Юго-Восточной Азией и Европой с дикими птицами, которые используют миграционные маршруты, пересекающиеся и проходящие через территорию Западной Сибири (S.J. Lycett et al., 2019), что согласуется с предложенной ранее гипотезой. Информация о видах птиц, от которых нами был выделен H5N1, указывает на возможное распространение этого вируса из эндемичных регионов на территорию России в будущем, а затем в другие соседние государства, так как большинство птиц являются мигрирующими. Важно отметить, что большинство вирусов в нашем исследовании было выделено от клинически здоровых грачей, следовательно, в некоторых видах птиц вирус H5N1 может сохраняться, не вызывая заболевание, что также способствует географическому распространению вируса гриппа, а равно сохранению угрозы возникновения новых вспышек.

Наибольшее распространение в России получили вирусы клады 2.3.4.4, циркулировавшие с 2016 года. Данное событие было отмечено Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций как 4 межконтинентальная волна распространения высокопатогенных ВГП.

На данный момент выделено четыре волны межконтинентального распространения гриппа (2005-2006, 2009-2010, 2014-2015, 2016-наст. время),

которые характеризовались распространением вируса гриппа H5 линии A/goose/Guangdong/1/96 (FAO, 2016).

Множественные случаи инфицирования людей вирусом A(H5N1) регистрировались в Юго-Восточной Азии, на Ближнем Востоке и Африке в ходе первой волны высокопатогенного гриппа птиц, вызванной вирусом клады 2.2. В то же время, большее количество случаев гибели дикой и домашней птицы было зафиксировано во время четвертой межконтинентальной волны осенью и зимой 2016-2017, чем за тот же промежуток времени первой межконтинентальной волны 2005-2006 годов (L.D. Sims et al., 2016).

Вторая межконтинентальная волна 2009-2010 была обусловлена циркуляцией высокопатогенного вируса гриппа субтипа H5N1 клады 2.3.2.1c в популяциях дикой и домашней птицы на территории России, Румынии, Болгарии, Непала, Японии и Кореи (L.D. Sims et al., 2017).

В третьей межконтинентальной волне 2014 – 2015 участвовали две отдельные генетические линии вируса и, для удобства, она была разделена на волны 3А и 3В. В межконтинентальную волну 3А вспышки инфекции вызвал высокопатогенный вирус гриппа A(H5N8) клады 2.3.4.4, который циркулировал в Республике Корея на момент весенней миграции 2014. Вирус этой клады - штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) был впоследствии выделен нами в северо-восточной части Российской Федерации на территории республики Саха (Якутия), в октябре 2014 года. В следующий зимний сезон (конец 2014 г. – начало 2015 г.) подобные штаммы неоднократно выделялись в Северной Европе: Германии, Нидерландах, Англии и Италии, Венгрии. Однако, благодаря таким превентивным мерам как соблюдение требований биобезопасности, раннее обнаружение, и строгие меры контроля за циркулирующей инфекцией и ее распространением, риски для промышленного птицеводства были минимизированы. Важной особенностью вирулентных штаммов волны 3А была очевидная бессимптомная инфекция у диких птиц, когда вирус редко выделялся от погибших особей.

Межконтинентальная волна 3В характеризовалась распространением высокопатогенного вируса гриппа А(Н5N1) клады 2.3.2.1с, который отличался от штаммов, циркулировавших во вторую волну 2009 года. Циркуляция подобных вирусов была нами зарегистрирована в Новосибирской области Российской Федерации весной 2015 года, затем вирус гриппа А(Н5N1) клады 2.3.2.1с был обнаружен на Ближнем Востоке и в Западной Африке, впоследствии вспышки регистрировались в Восточной Европе и Индии. Вирусы данной клады до сих пор вызывают вспышки заболевания среди птиц на Ближнем Востоке и остаются эндемичными в нескольких западноафриканских странах (FAO, 2016).

Таким образом, описываемая в данной работе система мониторинга позволила выявить на территории России циркуляцию высокопатогенных вариантов ВГП в ходе третьей и четвертой межконтинентальных волн распространения вируса.

Как говорилось выше, наибольшее распространение в России получили вирусы четвертой межконтинентальной волны распространения высокопатогенных ВГП, которая началась с появления ВГА подтипа Н5N8. В России первая вспышка Н5N8 произошла среди диких птиц в мае 2016 года на территории Республики Тыва, тогда мы смогли выделить первый изолят этого подтипа вируса. Впоследствии вирус распространился на запад, где вызвал масштабную эпизоотию среди диких и домашних птиц в европейской части России.

Хронология распространения высокопатогенного вируса гриппа Н5N8 в 2016 году, а также анализ выделенных штаммов указывает на то, что вирус гриппа распространился из юго-восточной Азии на территорию России с дикими птицами по Центрально-Азиатскому пролетному пути, который пролегает через республику Тыва (S.J. Lycett et al., 2019). Затем, с дикими птицами вирус распространился на запад, где он сначала был выделен от дикой птицы на территории Алтайского края, затем в Курганской области и в Республике Татарстан, а затем поразил частные подворья и птицефабрики на

территории Республики Калмыкия, в Астраханской области и других регионах Европейской части России. Следует отметить, что подобным образом в 2005 году распространялся высокопатогенный вирус гриппа H5N1, который впервые был зарегистрирован в Юго-Западной Сибири, а затем был занесен в европейскую часть России. Это в очередной раз подчеркивает ключевую роль диких птиц в распространении вируса гриппа.

Выделение вируса гриппа H5N8 клады 2.3.4.4 в республике Тыва и Европейской части России показывает, что данный вирус продолжил циркулировать в природе, приобретая в ходе эволюции новые свойства. Это было показано проведением вирусологических и молекулярно-генетических исследований. Повышенная вирулентность выделенных штаммов по сравнению с циркулировавшим ранее в России штаммом A/wigeon/Sakha/1/2014, а также потенциальная возможность передачи от человека к человеку заставляет уделять особое внимание распространению данного подтипа вируса, а также комплексно подходить к изучению его свойств. Так, нами было показано, что различные варианты вирусов клады 2.3.4.4 отличаются по антигенным свойствам и вирулентности. Например, результаты исследований штамма A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2), выделенного в 2017 году, показали, что он обладает уникальными характеристиками, потенциально влияющими на его вирулентность, которая, вероятно, может оказаться выше, чем вирулентность штаммов вируса гриппа A/H5N8, выделенных в то же время.

Помимо этого, в ходе мониторинга вируса гриппа на территории Саратовской области от сизой чайки в ноябре 2018 года был выделен вирус гриппа A/H5N6. Анализ штамма A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) выявил его принадлежность к кладе 2.3.4.4 вирусов гриппа H5. Однако, данный штамм относился к новой генетической группе 2.3.4.4h. Исследование антигенных свойств этого штамма также не выявили его родства с вирусами H5N8, циркулировавшими в России в то время и ранее. Надо сказать, что это первый описанный случай выделения вируса гриппа A/H5N6 клады 2.3.4.4 в

России и выявление его в Саратовской области является очень важным, так как показывает, насколько широки территориальные связи этих вирусов. Наиболее близкие варианты ВГП подтипа H5N6 были выделены на территории Юго-Восточной Азии. При этом аналогичные штаммы являлись высокопатогенными, тогда как штамм A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) оказался слабопатогенным, что, в свою очередь может объяснить некоторые механизмы распространения этих вариантов на дальние расстояния.

Если говорить о слабопатогенных вариантах вируса, то надо особо отметить выделение в 2018 году вирусов гриппа H9N2 на территории Дальнего Востока России, а также изоляцию вирусов гриппа H3N2 от свиней на территории Иркутской области.

Впервые вирус гриппа H9N2 был зарегистрирован в СССР еще в 1982 году на территории Приморского края. К сожалению, кроме факта выявления данного вируса в биоматериале от дикой птицы, нет достаточной информации, позволяющей как-то охарактеризовать данный вирус. Повторная регистрация случаев выявления вирусов H9N2 отмечена в 2002 году также на территории Приморского края России и также среди диких птиц (Д.К. Львов с соавт., 2004). В последующие годы вирусы данного подтипа на территории России не регистрировались до 2018 года, когда от кур на птицефабрике в Приморском крае нами были выделены вирусы гриппа H9N2 клады Y280. Учитывая то, что циркулировавшие ранее вирусы относились к линии вирусов диких птиц, находящейся в другой генетической группе, можно сказать, что в 2018 году нами впервые зарегистрирован занос вирусов гриппа H9N2 клады Y280 на территорию России.

Анализ выделенных на Дальнем Востоке России весной 2018 года вирусов гриппа H9N2 показал, что в одно и то же время циркулировали две различные генетические линии вируса гриппа H9N2. Хотя, изученные нами штаммы не обладали патогенными свойствами, все они были выделены во время вспышек на птицефабриках. Вероятно, гибель птиц была вызвана

другим инфекционным агентом, но циркуляция в популяциях птиц вирусов, потенциально способных заразить человека, заставляет уделять особое внимание распространению данных вариантов. Помимо вирусов, выделенных на Дальнем Востоке, нами зарегистрирована циркуляция штамма A/mallard/Tomsk/1391/2018 (H9N2), РНК которого была выявлена в биоматериале от дикой утки. Этот штамм относился к третьей генетической группе и также показал способность диких птиц распространять ВГП на дальние расстояния, так как наиболее близкие штаммы вирусов подтипа H9N2 имели происхождение из Юго-Восточной Азии. Наиболее вероятно, что также с дикими птицами вирус проник и на Дальний Восток России.

Вирусы гриппа птиц, в том числе подтипа H9N2, способны инфицировать различные виды млекопитающих и одним из важнейших восприимчивых хозяев является свинья. Как упоминалось ранее, свиньи считаются одним из основных потенциальных источников пандемических штаммов ВГА, которые могут появиться в результате реассортации различных вариантов вируса в организме животного. Эта гипотеза подтверждается зарегистрированными случаями межвидовой передачи вируса от птиц и людей свиньям, а также от свиней человеку. Показано, что источником штаммов вируса гриппа, ставших причиной двух пандемий прошлого века, а также пандемии 2009 года, были свиньи (G.J. Smith et al., 2009). Несмотря на это, степень восприимчивости свиней к вирусам гриппа птиц и механизмы адаптации вирусов гриппа птиц к свиньям окончательно не определены. В связи с этим, для оценки роли свиней как постоянных или промежуточных хозяев различных вариантов вируса гриппа, мониторинг ВГА среди свиней стал неотъемлемой частью системы мониторинга Роспотребнадзора.

В результате исследований в 2017 и в 2018 годах от свиней было выделено несколько штаммов вируса гриппа подтипа H3N2. Выделенные в данной работе вирусы являются классическими вирусами свиней, которые антигенно отличаются от большинства вакцинных штаммов ВГА человека. В

период 2015–2018 гг. циркуляции вирусов гриппа птиц или вирусов гриппа человека среди свиней выявлено не было.

Выделение два года подряд на свиноферме в Иркутской области вирусов гриппа подтипа H3N2, вероятно, свидетельствует о сохранении и продолжительной циркуляции данного варианта вируса в популяциях домашних животных, у которых при этом не наблюдалось клинической картины заболевания. В связи с этим, крайне важно отслеживать циркулирующие среди свиней варианты ВГА. В наших исследованиях биоматериал от свиней занимает небольшую часть от общего количества собранных проб и это говорит о том, что необходимо усиливать мониторинговые исследования на свинофермах и частных подворьях.

Тесный контакт человека и домашних животных постоянно поддерживает риск заражения людей вирусами гриппа. В связи с этим в наших исследованиях осуществлялся мониторинг ВГП среди людей, находящихся в группе риска, то есть по роду своей деятельности контактирующих с дикой или домашней птицей. К счастью, РНК вируса гриппа подтипов H5, H7, H9 не была выявлена ни в одном образце за весь период исследований. Тем не менее, при анализе 289 парных образцов сывороток крови сотрудников птицефабрик, на которых были зарегистрированы вспышки высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N8, в некоторых случаях были выявлены положительные пробы, что может свидетельствовать о контакте человека с вирусом, однако, в подавляющем большинстве случаев антитела к вирусам гриппа были выявлены уже в первых пробах.

В сыворотках крови, взятых от работников птицефабрики в Ростовской области и республики Калмыкия, были выявлены антитела к вирусу гриппа H5N1. При этом, уровень антител в большинстве случаев находился на уровне 1/20 – 1/40. Вероятно, появление антител было результатом других, более ранних вспышек, которые, возможно, прошли незаметно.

Только один случай сероконверсии был зарегистрирован у работника птицефабрики в Нижегородской области. Полученные результаты могут

свидетельствовать о том, что высокопатогенный вирус гриппа А(Н5N8), который вызвал вспышку в Нижегородской области, мог циркулировать в популяции домашних птиц, вызывая случаи заболевания и гибели, однако о массовом падеже домашней птицы сообщение поступило позже. Выявленные в первых сыворотках антитела к вирусу гриппа А(Н5N8), а также один случай сероконверсии свидетельствуют о контакте людей с вирусом гриппа птиц во время эпизоотии, хотя случаев непосредственного инфицирования людей выявлено не было.

Таким образом, результаты исследования сывороток крови на наличие антител к высокопатогенным вирусам гриппа говорят о том, что сотрудники птицефабрик, а также люди, которые выращивают домашнюю птицу, могут являться наиболее подверженной заражению группой населения. Несмотря на то, что случаев инфицирования вирусом гриппа выявлено не было, результаты данного исследования подчеркивают важность постоянного мониторинга вируса гриппа, а также популяционного иммунитета к его высокопатогенным вариантам, для оценки риска проникновения высокопатогенного вируса гриппа в человеческую популяцию.

Подводя итоги, можно сказать, что развитие ситуации по высокопатогенному вирусу гриппа или его другим вариантам во многом зависит от комплекса своевременно принятых соответствующими службами противоэпизоотических и противоэпидемических мер, которые должны быть направлены на недопущение дальнейшего распространения вируса и снижение риска инфицирования людей. В целом, можно отметить, что с момента выявления вирусов высокопатогенного гриппа на территории Российской Федерации в 2005 году не было зафиксировано ни одного случая заболевания или гибели человека от этих вирусов. Это позволяет сделать предположение о том, что в будущем известные в настоящий момент варианты вируса гриппа птиц не окажут влияния на заболеваемость и при соблюдении противоэпизоотических правил в местах вспышек ожидать случаев заболевания человека не придется.

Тем не менее, ежегодно сохраняется риск повторного заноса различных вариантов вируса гриппа на территорию России через территорию Дальнего Востока, как это случилось весной 2018 года, а также в европейскую часть России из очагов высокопатогенного вируса гриппа А/Н5 клады 2.3.4.4, которые регистрируются в странах Европы, Африки и на Ближнем Востоке. Также, учитывая основные миграционные маршруты диких перелетных птиц, надо быть готовыми к заносу новых вариантов вируса по Центрально-Азиатскому пролетному пути, который проходит через Центральную и Западную Сибирь. В связи с этим, необходимо усилить мониторинговые исследования в данных ключевых точках распространения вируса гриппа птиц для раннего обнаружения его циркулирующих вариантов. В случае выявления вируса гриппа или вспышек среди дикой или домашней птицы, вызванных его высокопатогенными вариантами, необходимо принимать незамедлительные ответные противоэпизоотические и противоэпидемические меры, которые позволят не допустить повторение сценария 2016–2018 гг. и предотвратить распространение высокопатогенного гриппа птиц в России.

Представленные в работе данные показали, что за 6 лет исследований, новая система мониторинга ВГП позволила на ранних этапах выявить циркуляцию наиболее важных и актуальных вариантов вируса гриппа птиц и оперативно реагировать на возникающие вспышки. Анализируя полученные результаты, очевидна необходимость постоянного совершенствования данной системы, однако уже сейчас видна неоспоримая эффективность созданной системы мониторинга вирусов гриппа птиц.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что система Роспотребнадзора по мониторингу вируса гриппа птиц обеспечивает раннее выявление циркуляции штаммов вируса гриппа с эпизоотологическим и пандемическим потенциалом.
2. В процессе выполнения работы из 49398 образцов биоматериала от людей и животных выделено 144 вируса гриппа А подтипов А/Н3N6, А/Н3N8, А/Н3N2sw, А/Н4N6, А/Н5N1, А/Н5N2, А/Н5N5, А/Н5N6, А/Н5N8, А/Н10N6, А/Н10N7, А/Н13N6, А/Н13N8, А/Н6N1, А/Н9N2. Выделенные штаммы охарактеризованы по основным биологическим свойствам - инфекционность, вирулентность, чувствительность к противовирусным препаратам.
3. Впервые на территории Российской Федерации выявлена циркуляция высокопатогенных вариантов вируса гриппа птиц подтипов А/Н5N8 клады 2.3.4.4а, А/Н5N5 клады 2.3.4.4b, А/Н5N2 клады 2.3.4.4b и А/Н5N6 клады 2.3.4.4h.
4. Доказано, что масштабная эпизоотия в Европейской части России, зарегистрированная в 2016-2018 гг., была вызвана высокопатогенным вариантом вируса гриппа птиц подтипа А/Н5N8 клады 2.3.4.4b.
5. Показано, что высокопатогенные вирусы гриппа подтипа А/Н5Nx были занесены на территорию Российской Федерации из стран Юго-Восточной Азии и распространялись с дикими мигрирующими птицами, при этом подтверждено, что основную роль в циркуляции вируса гриппа птиц играют дикие птицы отрядов гусеобразные и ржанкообразные.
6. При анализе биоматериала, взятого от людей, по роду своей деятельности контактирующих с дикой или домашней птицей, не было зафиксировано наличия маркёров вируса гриппа птиц, тем не менее, в сыворотках крови выявлены антитела к вирусам гриппа подтипов А/Н5N1 и А/Н5N8.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – М.: Медгиз, 1962. – 179 с.
2. Волков, М. С. Опыт ликвидации высокопатогенного гриппа птиц на территории Российской Федерации в 2016–2017 гг. / М. С. Волков, В. Н. Ирза, А. В. Варкентин. — Текст : непосредственный // Ветеринария сегодня. — 2018. — № 1(24). — С. 3-10.
3. Данчинова Г. А., Ляпунов А. В., Хаснатинов М. А., Манзарова Э. Л., Савченко А. П., Савченко П. А., Савченко И. А., Емельянов В. И., Карпова Н. В., Темерова В. Л., Тупицын И. И., Пыжьянов С. В. Разнообразие и распространение вирусов гриппа А среди птиц в Восточной Сибири // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2015. – № 5 (105). – С. 52–61.
4. Изучение циркуляции вируса гриппа птиц на территории убсунурского миграционного очага республики Тыва / М. С. Волков, А. В. Варкентин, В. Н. Ирза [и др.]. — Текст : непосредственный // Ветеринария сегодня. — 2016. — № 4(19). — С. 8-18.
5. Львов Д. К., Ямникова С. С., Федякина И. Т., Аристова В. А., Львов Д. Н., Ломакина Н. Ф., Петрова Е. С., Злобин В. И., Хаснатинов М. А., Чепургина Е. А., Ковтунов А. И., Джаркенов А. Ф., Санков М. Н., Леонова Г. Н., Маслов Д. В., Щелканов М. Ю., Непоклонов Е. А., Алипер Т. И. Экология и эволюция вирусов гриппа в России (1979–2002 гг.) // Вопросы вирусологии. – 2004. – Т. 49. – № 3. – С. 17–25.
6. Рослая И. Г., Росляков Г. Е., Львов Д. К. Циркуляция вируса гриппа в колониях серых цапель (*Ardea cinerea*) на Нижнем Амуре / Экология вирусов. – Вып. 3. – М., 1975. – С. 138–142.
7. Рослая И. Г., Росляков Г. Е., Львов Д. К., Исаченко В. А., Закстельская Л. Я., Троп И. Т. Циркуляция арбо и миксовирусов в популяциях

- водоплавающих и околоводных птиц Нижнего Амура. Изоляция штаммов вируса гриппа / Экология вирусов. – Вып. 2. – М., 1974. – С. 148–156.
8. Савченко А. П., Савченко П. А. Миграции птиц Центральной Сибири и распространение вирусов гриппа А. – Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2014. – 256 с.
9. Савченко А. П., Савченко П. А., Савченко И. А., Емельянов В. И., Карпова Н. В., Ляпунов А. В., Хаснатинов М. А., Данчинова Г. А. Виды птиц – основные носители и переносчики вирусов гриппа А в Восточной Сибири // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2015. – № 4 (104). – С. 102–111.
10. Савченко П. А., Савченко А. П., Емельянов В. И., Карпова Н. В., Темерова В. Л. Участие диких и синантропных птиц в циркуляции вирусов гриппа А (ВГА) на территории Центральной Сибири // Материалы XIV Международной орнитологической конференции Северной Евразии (18–24 августа 2015, Алматы, Казахстан). – Алматы: КазНУ, 2015. – С. 436–438.
11. Сайфутдинова С. Г., Зайковская А. В., Шестопапов А. М., Герасимов Ю. Н., Бухалова Р. В., Завгарова Ю. Р., Мацина Е. Л., Мацина А. И. Мониторинг вируса гриппа типа А у диких птиц на территории Камчатки // Материалы XI Международной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения выдающихся российских ихтиологов А. П. Андрияшева и А. Я. Таранца «Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей» (24–25 ноября 2010, Петропавловск-Камчатский). – Петропавловск-Камчатский, 2010. – С. 52–55.
12. Сайфутдинова С. Г., Силко Н. Ю., Зайковская А. В., Шестопапов А. М., Герасимов Н. Ю., Мацина А. И., Вальчук О. П., Сурмач С. Г., Антонов А. И., Марковец М. Ю., Друзьяка А. В., Дроздов И. Г. Генотипирование

- вируса гриппа типа А у диких птиц на территории Дальнего Востока // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2010. – Т. 8. – № 2. – С. 29–32.
13. Сайфутдинова С. Г., Шаршов К. А., Герасимов Ю. Н., Шестопапов А. М. Экология вируса гриппа у чаек Дальнего Востока России // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2012. – № 5-1 (87). – С. 316–318.
14. Сивай М. В., Ильиных Ф. А., Кулак М. В., Шестопапова Е. М., Юрлов А. К., Шестопапов А. М., Дроздов И. Г. Анализ циркуляции вируса гриппа типа А на территории Чановской озерной системы // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2010. – Т. 8. – № 2. – С. 25–28.
15. Сивай М. В., Шаршов К. А., Прокудин А. В., Лайшев К. А., Шестопапов А. М. Вирус гриппа А в популяциях диких птиц юга Западной Сибири (2009–2010 гг.) // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2016. – № 1 (29). – С. 38–44.
16. Сивай М. В., Юрлов А. К., Друзяка А. В., Шаршов К. А., Шестопапов А. М. Уникальные варианты вируса гриппа у птиц юга Западной Сибири // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2012. – № 5-1 (87). – С. 319–322.
17. Шаршов К. А., Сивай М. В., Глущенко А. В., Курская О. Г., Гуляева М. А., Алексеев А. Ю., Шестопапов А. М. Результаты мониторинга вируса гриппа В в популяциях диких птиц Западной Сибири (2014) // Материалы Седьмой всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (8–10 апреля 2015, Новосибирск). – Новосибирск: Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины, 2015. – С. 318–319.

18. Эпизоотологический мониторинг гриппа птиц на территории республики Крым / Д. В. Гадзевич, С. И. Данильченко, С. Г. Ерофеев [и др.]. — Текст : непосредственный // Ветеринария сегодня. — 2019. — № 1(28). — С. 34-38.
19. Юрлов К. Т. Экология и биоценоотические связи перелетных птиц Западной Сибири. — Новосибирск: Наука, 1981. — 364 с.
20. A comprehensive surveillance of adamantane resistance among human influenza A virus isolated from mainland China between 1956 and 2009. / Y. Lan, Y. Zhang, L. Dong [и др.]. — Текст : непосредственный // Antivir Ther. — 2010. — № 15. — С. 853–859.
21. A genetically engineered waterfowl influenza virus with a deletion in the stalk of the neuraminidase has increased virulence for chickens / S. Munier, T. Larcher, F. Cormier-Aline [и др.]. — Текст : непосредственный // J Virol. — 2010. — № 84. — С. 940–952.
22. A single amino acid in the M1 protein responsible for the different pathogenic potentials of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains. / N. Nao, M. Kajihara, R. Manzoor [и др.]. — Текст : непосредственный // PLoS ONE. — 2015. — № 10. — С. e0137989.
23. A revised system of nomenclature for influenza viruses // Bulletin of the World Health Organization. — 1971. — V. 45. — № 1. — P. 119–124.
24. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum // Bulletin of the World Health Organization. — 1980. — V. 58. — № 4. — P. 585–591.
25. Abbas M. A., Spackman E., Fouchier R., Smith D., Ahmed Z., Siddique N., Sarmiento L., Naeem K., McKinley E. T., Hameed A., Rehmani S., Swayne D. E. H7 avian influenza virus vaccines protect chickens against challenge with antigenically diverse isolates // Vaccine. — 2011. — V. 29. — № 43. — P. 7424–7429.
26. Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902–2013): frequency and distribution of M2 gene mutations. / G. Dong, C. Peng, J. Luo

- [и др.]. — Текст : непосредственный // PLoS ONE. — 2015. — № 10. — С. e0119115–e0119115.
27. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing / M. Selman, SK Dankar, NE Forbes [и др.]. — Текст : непосредственный // Emerg Microb Infect. — 2012. — № 1. — С. 1-10.
28. Adlhoch C., Gossner C., Koch G., Brown I., Bouwstra R., Verdonck F., Penttinen P., Harder T. Comparing introduction to Europe of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8) in 2014 and A(H5N1) in 2005 // Eurosurveillance. — 2014. — V. 19. — № 50.
29. Alexander D. J. Avian influenza – historical aspects // Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza (3–5 September 1986, Athens, United States). – Athens: US Animal Health Association, 1987. – P. 4–13.
30. Alexander D. J., Brown I. H. History of highly pathogenic avian influenza // OIE Revue Scientifique et Technique. – 2009. – V. 28. – № 1. – P. 19–38.
31. Allerson M., Deen J., Detmer S. E., Gramer M. R., Joo H. S., Romagosa A., Torremorell M. The impact of maternally derived immunity on influenza A virus transmission in neonatal pig populations // Vaccine. – 2013. – V. 31. – № 3. – P. 500–505.
32. Allison A. B., Ballard J. R., Tesh R. B., Brown J. D., Ruder M. G., Keel M. K., Munk B. A., Mickley R. M., Gibbs S. E. J., Travassos da Rosa A. P. A., Ellis J. C., Ip H. S., Shearn-Bochsler V. I., Rogers M. B., Ghedin E., Holmes E. C., Parrish C. R., Dwyer C. Cyclic avian mass mortality in the northeastern United States is associated with a novel orthomyxovirus // Journal of Virology. – 2015. – V. 89. – № 2. – P. 1389–1403.
33. Alonso-Caplen F. V., Nemeroff M. E., Qiu Y., Krug R. M. Nucleocytoplasmic transport: The influenza virus NS1 protein regulates the transport of spliced NS2 mRNA and its precursor NS1 mRNA // Genes and Development. – 1992. – V. 6. – № 2. – P. 255–267.

34. Anderson T. K., Nelson M. I., Kitikoon P., Swenson S. L., Korlund J. A., Vincent A. L. Population dynamics of cocirculating swine influenza A viruses in the United States from 2009 to 2012 // *Influenza and other Respiratory Viruses*. – 2013. – V. 7. – Suppl. 4. – P. 42–51.
35. Animal and Plant Health Agency. Situation assessment following detection and spread of H5N8 HPAI in EU Member States since October 2016. – 2016. – Текст: электронный. – URL: <https://science.vla.gov.uk/flu-lab-net/docs/outbreak-hpai-h5n8-europe.pdf> (дата обращения: 05.09.2020).
36. Arnal A., Vittecoq M., Pearce-Duvet J., Gauthier-Clerc M., Boulinier T., Jourdain E. Laridae: A neglected reservoir that could play a major role in avian influenza virus epidemiological dynamics // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2015. – V. 41. – № 4. – P. 508–519.
37. Artois J., Jiang H., Wang X., Qin Y., Pearcy M., Lai S., Shi Y., Zhang J., Peng Z., Zheng J., He Y., Dhingra M. S., von Dobschuetz S., Guo F., Martin V., Kalpravidh W., Claes F., Robinson T., Hay S. I., Xiao X., Feng L., Gilbert M., Yu H. Changing geographic patterns and risk factors for avian influenza A(H7N9) infections in humans, China // *Emerging Infectious Diseases*. – 2018. – V. 24. – № 1. – P. 87–94.
38. Asplin F. D. Examination of sera from wildfowl for antibodies against the viruses of duck plague, duck hepatitis and duck influenza // *The Veterinary Record*. – 1970. – V. 87. – № 7. – P. 182–183.
39. Aubin J. T., Azebi S., Balish A., Banks J., Bhat N., Bright R. A., Brown I., Buchy P., Burguiere A. M., Chen H. I., Cheng P., Cox N. J., Crosier A., Curns A., Cuvelier F., Deng G., Desheva J., Desvaux S., Diep N. H., Donis R. O., Douglas A., Dowell S. F., Dung N. T., Edwards L., Fukuda K., Garten R., Govorkova E., Gregory V., Hampson A., Hanh N. T. H., Harper S., Hay A., Hoffmann E., Hulse D., Imai M., Itamura S., Jadhao S., Jeannin P., Kang C., Katz J., Kim J. H., Klimov A., Kwon Y. K., Lee C. W., Lien P. S., Li Y., Lim W., Lin Y. P., Lindstrom S., Loftin L., Mabry J., Mai L. Q., Maines T., Manuguerra J. C., Mase M., Matsuoka Y., McCarron M., Medina M. J.,

- Nguyen D., Ninomiya A., Obuchi M., Odagiri T., Peiris M., Perdue M. L., Reynes J. M., Robertson J., Rousseaux C., Saito T., Sangkitporn S., Shaw M., Simmerman J. M., Slomka M., Smith C., Sorn S., Spackman E., Stöhr K., Suarez D. L., Sung H. W., Swayne D. E., Tardy-Panit M., Tashiro M., Thawatsupha P., Tumpey T., Uyeki T., Van Tu P., Van Der Werf S., Vong S., Webby R., Webster R., Wood J., Xu X., Yi G., Zhang W. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia // *Emerging Infectious Diseases*. – 2005. – V. 11. – № 10. – P. 1515–1521.
40. Avian influenza overview December 2020 - February 2021 / Adlhoch, C., Fusaro [и др.] // *EFSA journal*. European Food Safety Authority. — 2021. — № 19(3): 6497. — C. 1-74.
41. Bahl J., Krauss S., Kühnert D., Fourment M., Raven G., Pryor S. P., Niles L. J., Danner A., Walker D., Mendenhall I. H., Su Y. C. F., Dugan V. G., Halpin R. A., Stockwell T. B., Webby R. J., Wentworth D. E., Drummond A. J., Smith G. J. D., Webster R. G. Influenza A virus migration and persistence in North American wild birds // *PLoS Pathogens*. – 2013. – V. 9. – № 8.
42. Bahl J., Pham T. T., Hill N. J., Hussein I. T. M., Ma E. J., Easterday B. C., Halpin R. A., Stockwell T. B., Wentworth D. E., Kayali G., Krauss S., Schultz-Cherry S., Webster R. G., Webby R. J., Swartz M. D., Smith G. J. D., Runstadler J. A. Ecosystem interactions underlie the spread of avian influenza A viruses with pandemic potential // *PLoS Pathogens*. – 2016. – V. 12. – № 5.
43. Bahl J., Vijaykrishna D., Holmes E. C., Smith G. J. D., Guan Y. Gene flow and competitive exclusion of avian influenza A virus in natural reservoir hosts // *Virology*. – 2009. – V. 390. – № 2. – P. 289–297.
44. Bao-Feng Qiu et al. A reverse transcription-PCR for subtyping of the neuraminidase of avian influenza viruses // *Journal of Virological Methods*. - 2009. -155. –P. 193–198.
45. Bean W. J., Kawaoka Y., Wood J. M. Characterization of virulent and avirulent A/chicken/Pennsylvania/83 influenza A viruses: Potential role of

- defective interfering RNAs in nature // *Journal of Virology*. – 1985. – V. 53. – № 4. – P. 151–160.
46. Beard C. W., Helfer D. H. Isolation of two turkey influenza viruses in Oregon // *Avian diseases*. – 1972. – V. 16. – № 5. – P. 1133–1136.
47. Beare A. S., Webster R. G. Replication of avian influenza viruses in humans // *Archives of Virology*. – 1991. – V. 119. – № 1–2. – P. 37–42.
48. Beaton A. R., Krug R. M. Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1986. – V. 83. – № 17. – P. 6282–6286.
49. Becker W. B. The isolation and classification of Tern virus: Influenza virus A/Tern/South Africa/1961 // *Journal of Hygiene*. – 1966. – V. 64. – № 3. – P. 309–320.
50. Bi Y., Chen Q., Wang Q., Chen J., Jin T., Wong G., Quan C., Liu J., Wu J., Yin R., Zhao L., Li M., Ding Z., Zou R., Xu W., Li H., Wang H., Tian K., Fu G., Huang Y., Shestopalov A., Li S., Xu B., Yu H., Luo T., Lu L., Xu X., Luo Y., Liu Y., Shi W., Liu D., Gao G. F. Genesis, evolution and prevalence of H5N6 avian influenza viruses in China // *Cell Host and Microbe*. – 2016. – V. 20. – № 6. – P. 810–821.
51. Bi Y., Liu H., Xiong C., Di L., Shi W., Li M., Liu S., Chen J., Chen G., Li Y., Yang G., Lei Y., Xiong Y., Lei F., Wang H., Chen Q., Chen J., Gao G. F. Novel avian influenza A (H5N6) viruses isolated in migratory waterfowl before the first human case reported in China, 2014 // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6.
52. Birch-Machin I., Rowan A., Pick J., Mumford J., Binns M. Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus: Detection of anti-NS1 antibody in post infection equine sera // *Journal of Virological Methods*. – 1997. – V. 65. – № 2. – P. 255–263.
53. Blaskovic D., Rathová V., Skoda R., Kocisková D., Kaplan M. M. Experimental infection of weanling pigs with A-swine influenza virus. I.

- Epidemiology and serological response // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1970. – V. 42. – № 5. – P. 757–765.
54. Bodewes R., Kuiken T. Changing role of wild birds in the epidemiology of avian influenza A viruses // *Advances in Virus Research*. – 2018. – V. 100. – P. 279–307.
55. Boudreault A., Lecomte J., Hinshaw V. S. Antigenic characterization of influenza A viruses isolated from avian species in Ontario, Quebec and Maritimes during the 1977 season // *Revue Canadienne de Biologie*. – 1980. – V. 39. – № 2. – P. 107–114.
56. Bouloy M., Morgan M. A., Shatkin A. J., Krug R. M. Cap and internal nucleotides of reovirus mRNA primers are incorporated into influenza viral complementary RNA during transcription in vitro // *Journal of Virology*. – 1979. – V. 32. – № 3. – P. 895–904.
57. Bouloy M., Plotch S. J., Krug R. M. Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1978. – V. 75. – № 10. – P. 4886–4890.
58. Bourmakina S. V., García-Sastre A. Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus // *Journal of General Virology*. – 2003. – V. 84. – № 3. – P. 517–527.
59. Bowes V. A. After the outbreak: How the British Columbia commercial poultry industry recovered after H7N3 HPAI // *Avian Diseases*. – 2007. – V. 51. – Suppl. 1. – P. 313–316.
60. Brown I. H., Done S. H., Spencer Y. I., Cooley W. A., Harris P. A., Alexander D. J. Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains // *The Veterinary Record*. – 1993. – V. 132. – № 24. – P. 598–602.
61. Brown I. H., Harris P. A., Alexander D. J. Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991–2 // *Epidemiology and Infection*. – 1995. – V. 114. – № 3. – P. 511–520.

62. Brown J. D., Stallknecht D. E., Berghaus R. D., Luttrell M. P., Velek K., Kistler W., Costa T., Yabsley M. J., Swayne D. Evaluation of a commercial blocking enzyme-linked immunosorbent assay to detect avian influenza virus antibodies in multiple experimentally infected avian species // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2009. – V. 16. – № 6. – P. 824–829.
63. Brown J. D., Stallknecht D. E., Swayne D. E. Experimental infection of swans and geese with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) of Asian lineage // *Emerging Infectious Diseases*. – 2008. – V. 14. – № 1. – P. 136–142.
64. Brugh M., Johnson D. C. Epidemiology of avian influenza in domestic poultry // *Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza (3–5 September 1986, Athens, United States)*. – Athens: US Animal Health Association, 1987. – P. 177–186.
65. Bullough P. A., Hughson F. M., Skehel J. J., Wiley D. C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion // *Nature*. – 1994. – V. 371. – № 6492. – P. 37–43.
66. Buonagurio D. A., Nakada S., Parvin J. D., Krystal M., Palese P., Fitch W. M. Evolution of human influenza A viruses over 50 years: Rapid, uniform rate of change in NS gene // *Science*. – 1986. – V. 232. – № 4753. – P. 980–982.
67. Burnet F. M. Influenza virus on the developing egg: I. Changes associated with the development of an egg-passage strain of virus // *British Journal of Experimental Pathology*. – 1936. – V. 17. – № 4. – P. 282–293.
68. Burnet F. M., Ferry J. D. The differentiation of the viruses of fowl plague and Newcastle disease: experiments using the technique of chorio-allantoic membrane inoculation of the developing egg // *British Journal of Experimental Pathology*. – 1934. – V. 15. – № 1. – P. 56–64.
69. Bush R. M., Bender C. A., Subbarao K., Cox N. J., Fitch W. M. Predicting the evolution of human influenza A // *Science*. – 1999. – V. 286. – № 5446. – P. 1921–1925.

70. Cappelle J., Zhao D., Gilbert M., Nelson M. I., Newman S. H., Takekawa J. Y., Gaidet N., Prosser D. J., Liu Y., Li P., Shu Y., Xiao X. Risks of avian influenza transmission in areas of intensive free-ranging duck production with wild waterfowl // *EcoHealth*. – 2014. – V. 11. – № 1. – P. 109–119.
71. Capua I., Alexander D. J. Avian influenza: Recent developments // *Avian Pathology*. – 2004. – V. 33. – № 4. – P. 393–404.
72. Capua I., Alexander D. J. The challenge of avian influenza to the veterinary community // *Avian Pathology*. – 2006. – V. 35. – № 3. – P. 189–205.
73. Capua I., Mutinelli F., Marangon S., Alexander D. J. H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys // *Avian Pathology*. – 2000. – V. 29. – № 6. – P. 537–543.
74. Chan P. K. S. Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997 // *Clinical Infectious Diseases*. – 2002. – V. 34. – Suppl. 2. – P. S58–S64.
75. Chang C. F., King C. C., Wan C. H., Chang Y. C., Chan T. C., Lee C. C. D., Chou P. H. B., Li Z. R. T., Li Y. T., Tseng T. J., Lee P. F., Chang C. H. Lessons from the largest epidemic of avian influenza viruses in Taiwan, 2015 // *Avian Diseases*. – 2016. – V. 60. – № 1. – P. 156–171.
76. Changes in the length of the neuraminidase stalk region impact H7N9 virulence in mice / Y. Bi, H. Xiao, Q. Chen [и др.]. — Текст : непосредственный // *J Virol*. — 2016. — № 90. — С. 2142–2149.
77. Chen H., Smith G. J. D., Li K. S., Wang J., Fan X. H., Rayner J. M., Vijaykrishna D., Zhang J. X., Zhang L. J., Guo C. T., Cheung C. L., Xu K. M., Duan L., Huang K., Qin K., Leung Y. H. C., Wu W. L., Lu H. R., Chen Y., Xia N. S., Naipospos T. S. P., Yuen K. Y., Hassan S. S., Bahri S., Nguyen T. D., Webster R. G., Peiris J. S. M., Guan Y. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: Implications for pandemic control // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – V. 103. – № 8. – P. 2845–2850.

- 78.Chen H., Smith G. J. D., Zhang S. Y., Qin K., Wang J., Li K. S., Webster R. G., Peiris J. S. M., Guan Y. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl // *Nature*. – 2005. – V. 436. – № 7048. – P. 191–192.
- 79.Chen W., Calvo P. A., Malide D., Gibbs J., Schubert U., Bacik I., Basta S., O'Neill R., Schickli J., Palese P., Henklein P., Bennink J. R., Yewdell J. W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death // *Nature Medicine*. – 2001. – V. 7. – № 12. – P. 1306–1312.
- 80.Chen Y., Liang W., Yang S., Wu N., Gao H., Sheng J., Yao H., Wo J., Fang Q., Cui D., Li Y., Yao X., Zhang Y., Wu H., Zheng S., Diao H., Xia S., Zhang Y., Chan K. H., Tsoi H. W., Teng J. L. L., Song W., Wang P., Lau S. Y., Zheng M., Chan J. F. W., To K. K. W., Chen H., Li L., Yuen K. Y. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: Clinical analysis and characterisation of viral genome // *The Lancet*. – 2013. – V. 381. – № 9881. – P. 1916–1925.
- 81.Cheon S. H., Lee Y. N., Kang S. I., Kye S. J., Lee E. K., Heo G. B., Lee M. H., Kim J. W., Lee K. N., Son H. M., Lee Y. J. Genetic evidence for the intercontinental movement of avian influenza viruses possessing North American-origin nonstructural gene allele B into South Korea // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2018. – V. 66. – P. 18–25.
- 82.Choi W. S., Baek Y. H., Kwon J. J., Jeong J. H., Park S. J., Kim Y. I., Yoon S. W., Hwang J., Kim M. H., Kim C. J., Webby R. J., Choi Y. K., Song M. S. Rapid acquisition of polymorphic virulence markers during adaptation of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus in the mouse // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7.
- 83.Choi Y. K., Ozaki H., Webby R. J., Webster R. G., Peiris J. S., Poon L., Butt C., Leung Y. H. C., Guan Y. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China // *Journal of Virology*. – 2004. – V. 78. – № 16. – P. 8609–8614.
- 84.Ciacci Zanella J. R., Vincent A. L., Zanella E. L., Lorusso A., Loving C. L., Brockmeier S. L., Gauger P. C., Janke B. H., Gramer M. R. Comparison of

- human-like H1 ( $\delta$ -Cluster) influenza A viruses in the swine host // *Influenza Research and Treatment*. – 2012. – V. 2012. – P. 329029.
85. Claas E. C. J., De Jong J. C., Van Beek R., Rimmelzwaan G. F., Osterhaus A. D. M. E. Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection // *Vaccine*. – 1998. – V. 16. – № 9–10. – P. 977–978.
86. Claas E. C. J., Osterhaus A. D. M. E., Van Beek R., De Jong J. C., Rimmelzwaan G. F., Senne D. A., Krauss S., Shortridge K. F., Webster R. G. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus // *The Lancet*. – 1998. – V. 351. – № 9101. – P. 472–477.
87. Claes F., Morzaria S. P., Donis R. O. Emergence and dissemination of clade 2.3.4.4 H5Nx influenza viruses – How is the Asian HPAI H5 lineage maintained // *Current Opinion in Virology*. – 2016. – V. 16. – P. 158–163.
88. Collin E. A., Sheng Z., Lang Y., Ma W., Hause B. M., Li F. Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle // *Journal of Virology*. – 2015. – V. 89. – № 2. – P. 1036–1042.
89. Collins P. J., Vachieri S. G., Haire L. F., Ogradowicz R. W., Martin S. R., Walker P. A., Xiong X., Gamblin S. J., Skehel J. J. Recent evolution of equine influenza and the origin of canine influenza // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – V. 111. – № 30. – P. 11175–11180.
90. Coman A., Maftai D. N., Krueger W. S., Heil G. L., Chereches R. M., Sirlincan E., Bria P., Dragnea C., Kasler I., Valentine M. A., Gray G. C. A prospective study of Romanian agriculture workers for zoonotic influenza infections // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9. – № 5.
91. Connor R. J., Kawaoka Y., Webster R. G., Paulson J. C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates // *Virology*. – 1994. – V. 205. – № 1. – P. 17–23.
92. Corzo C. A., Culhane M., Dee S., Morrison R. B., Torremorell M. Airborne detection and quantification of swine influenza A virus in air samples

- collected inside, outside and downwind from swine barns // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – № 8.
93. Corzo C. A., Culhane M., Juleen K., Stigger-Rosser E., Ducatez M. F., Webby R. J., Lowe J. F. Active surveillance for influenza A virus among swine, midwestern United States, 2009–2011 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2013. – V. 19. – № 6. – P. 954–960.
94. Corzo C. A., Morrison R. B., Fitzpatrick A. M., Culhane M. R. Risk factors for detecting influenza A virus in growing pigs // *Journal of Swine Health and Production*. – 2014. – V. 22. – № 4. – P. 176–184.
95. Corzo C. A., Romagosa A., Dee S. A., Gramer M. R., Morrison R. B., Torremorell M. Relationship between airborne detection of influenza A virus and the number of infected pigs // *Veterinary Journal*. – 2013. – V. 196. – № 2. – P. 171–175.
96. Curran J. M., Ellis T. M., Robertson I. D. Surveillance of charadriiformes in Northern Australia shows species variations in exposure to avian influenza virus and suggests negligible virus prevalence // *Avian Diseases*. – 2014. – V. 58. – № 2. – P. 199–204.
97. Dasen C. A., Laver W. G. Antibodies to influenza viruses (including the human A2-Asian-57 strain) in sera from Australian shearwaters (*Puffinus pacificus*) // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1970. – V. 42. – № 6. – P. 885–889.
98. Davison S., Eckroade R. J., Ziegler A. F. A review of the 1996–98 nonpathogenic H7N2 avian influenza outbreak in Pennsylvania // *Avian Diseases*. – 2003. – V. 47. – P. 823–827.
99. Dawood F. S., Iuliano A. D., Reed C., Meltzer M. I., Shay D. K., Cheng P. Y., Bandaranayake D., Breiman R. F., Brooks W. A., Buchy P., Feikin D. R., Fowler K. B., Gordon A., Hien N. T., Horby P., Huang Q. S., Katz M. A., Krishnan A., Lal R., Montgomery J. M., Mølbak K., Pebody R., Presanis A. M., Razuri H., Steens A., Tinoco Y. O., Wallinga J., Yu H., Vong S., Bresee J., Widdowson M. A. Estimated global mortality associated with the first 12

- months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: A modelling study // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2012. – V. 12. – № 9. – P. 687–695.
100. Dawood F. S., Jain S., Finelli L., Shaw M. W., Lindstrom S., Garten R. J., Gubareva L. V., Xu X., Bridges C. B., Uyeki T. M. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans // *New England Journal of Medicine*. – 2009. – V. 360. – № 25. – P. 2605–2615.
101. De Graaf M., Fouchier R. A. M. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis // *EMBO Journal*. – 2014. – V. 33. – № 8. – P. 823–841.
102. De Jong J. C., Claas E. C. J., Osterhaus A. D. M. E., Webster R. G., Lim W. L. A pandemic warning? // *Nature*. – 1997. – V. 389. – № 6651. – P. 554.
103. De Marco M. A., Sharshov K., Shestopalov A., Gulyaeva M., Delogu M., Ciccicarese L., Castrucci M. R. Ecology of avian influenza viruses in Siberia / *Siberia: Ecology, Diversity and Environmental Impact*. – New York: Nova Science Publishers, 2016. – P. 83–160.
104. DeJesus E., Costa-Hurtado M., Smith D., Lee D. H., Spackman E., Kapczynski D. R., Torchetti M. K., Killian M. L., Suarez D. L., Swayne D. E., Pantin-Jackwood M. J. Changes in adaptation of H5N2 highly pathogenic avian influenza H5 clade 2.3.4.4 viruses in chickens and mallards // *Virology*. – 2016. – V. 499. – P. 52–64.
105. Delmarva Poultry Industry. Proceedings of the 39th National Meeting on Poultry Health and Processing. – Georgetown: Delmarva Poultry Industry, 2004.
106. Detmer S. E., Gramer M. R., King V. L., Mathur S., Rapp-Gabrielson V. J. In vivo evaluation of vaccine efficacy against challenge with a contemporary field isolate from the  $\alpha$  cluster of H1N1 swine influenza virus // *Canadian Journal of Veterinary Research*. – 2013. – V. 77. – № 1. – P. 24–32.

107. Dhingra M. S., Artois J., Dellicour S., Lemey P., Dauphin G., Von Dobschuetz S., Van Boeckel T. P., Castellan D. M., Morzaria S., Gilbert M. Geographical and historical patterns in the emergences of novel highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5 and H7 viruses in poultry // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2018. – V. 5.
108. Dhingra M. S., Artois J., Robinson T. P., Linard C., Chaiban C., Xenarios I., Engler R., Liechti R., Kuznetsov D., Xiao X., Von Dobschuetz S., Claes F., Newman S. H., Dauphin G., Gilbert M. Global mapping of highly pathogenic avian influenza H5N1 and H5Nx clade 2.3.4.4 viruses with spatial cross-validation // *eLife*. – 2016. – V. 5.
109. Dinter Z. Avian myxoviruses / Newcastle disease virus: an evolving pathogen. – Madison: University of Wisconsin Press, 1964. – P. 299–311.
110. Dinter Z. Eine variante des virus der Geflügelpest in Bayern? // *Tierärztl Umschau*. – 1949. – V. 4. – P. 185–186.
111. Disease events of avian influenza 2004–2018 : [сайт]. – 2018. – URL: <http://empres-i.fao.org/eipws3g/> (дата обращения: 05.09.2020).
112. Donatelli I., Campitelli L., Di Trani L., Puzelli S., Selli L., Fioreti A., Alexander D. J., Tollis M., Krauss S., Webster R. G. Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian poultry // *Journal of General Virology*. – 2001. – V. 82. – № 3. – P. 623–630.
113. Donis R. O., Smith G. J. D., Perdue M. L., Brown I. H., Chen H., Fouchier R. A. M., Kawaoka Y., Mackenzie J., Shu Y., Capua I., Cox N., Davis T., Garten R., Smith C., Guan Y., Vijaykrishna D., Mumford E., Russell C. A., Smith D. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) // *Emerging Infectious Diseases*. – 2008. – V. 14. – № 7.
114. Donis R. O., Smith G., Brown I. H., Capua I., Cattoli G., Chen H., Cox N., Davis C. T., Donis R. O., Fouchier R. A. M., Garten R., Guan Y., Hay A., Kawaoka Y., Mackenzie J., McCauley J., Mumford E., Olsen C., Perdue M. L., Russell C. A., Smith C., Smith D., Smith G. J. D., Shu Y., Tashiro M.,

- Vijaykrishna D., Webster R. Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: Divergence of clade 2.2 viruses // *Influenza and other Respiratory Viruses*. – 2009. – V. 3. – № 2. – P. 59–62.
115. Dowdle W. R., Schild G. C. Influenza: its antigenic variation and ecology // *Bulletin of the Pan American Health Organization*. – 1976. – V. 10. – № 3. – P. 193–195.
116. Downie J. C., Hinshaw V., Laver W. G. The ecology of influenza. Isolation of type 'A' influenza viruses from Australian pelagic birds // *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. – 1977. – V. 55. – № 6. – P. 635–643.
117. Downie J. C., Laver W. G. Isolation of a type A influenza virus from an Australian pelagic bird // *Virology*. – 1973. – V. 51. – № 2. – P. 259–269.
118. Downie J. C., Webster R. G., Schild G. C., Dowdle W. R., Laver W. G. Characterization and ecology of a type A influenzavirus isolated from a sheawater // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1973. – V. 49. – № 6. – P. 559–566.
119. Doyle T. M. A hitherto unrecorded diseases of fowls due to a filter-passing virus // *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. – 1927. – V. 40. – P. 144–169.
120. Duan L., Bahl J., Smith G. J. D., Wang J., Vijaykrishna D., Zhang L. J., Zhang J. X., Li K. S., Fan X. H., Cheung C. L., Huang K., Poon L. L. M., Shortridge K. F., Webster R. G., Peiris J. S. M., Chen H., Guan Y. The development and genetic diversity of H5N1 influenza virus in China, 1996–2006 // *Virology*. – 2008. – V. 380. – № 2. – P. 243–254.
121. Duan L., Campitelli L., Fan X. H., Leung Y. H. C., Vijaykrishna D., Zhang J. X., Donatelli I., Delogu M., Li K. S., Foni E., Chiapponi C., Wu W. L., Kai H., Webster R. G., Shortridge K. F., Peiris J. S. M., Smith G. J. D., Chen H., Guan Y. Characterization of low-pathogenic H5 subtype influenza

- viruses from Eurasia: Implications for the origin of highly pathogenic H5N1 viruses // *Journal of Virology*. – 2007. – V. 81. – № 14. – P. 7529–7539.
122. Ducatez M. F., Olinger C. M., Owoade A. A., Tarnagda Z., Tahita M. C., Sow A., De Landtsheer S., Ammerlaan W., Ouedraogo J. B., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M., Muller C. P. Molecular and antigenic evolution and geographical spread of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in Western Africa // *Journal of General Virology*. – 2007. – V. 88. – № 8. – P. 2297–2306.
123. Ducatez M., Sonnberg S., Crumpton J. C., Rubrum A., Phommachanh P., Douangngeun B., Peiris M., Guan Y., Webster R., Webby R. Highly pathogenic avian influenza H5N1 clade 2.3.2.1 and clade 2.3.4 viruses do not induce a clade-specific phenotype in mallard ducks // *Journal of General Virology*. – 2017. – V. 98. – № 6. – P. 1232–1244.
124. Easterday B. C., Trainer D. O., Tůmová B., Pereira H. G. Evidence of infection with influenza viruses in migratory waterfowl // *Nature*. – 1968. – V. 219. – № 5153. – P. 523–524.
125. Easterday B. C., Tumova B. *Avian influenza / Diseases of poultry*. – 6th edition. – Ames: Iowa State University Press, 1972. – P. 670–700.
126. *Ecology of avian influenza viruses in Siberia* / M. A. De Marco [и др.]. – New York : Nova Science Publishers, Inc., 2016. – 83-160 с.
127. Elder K. T., Bye J. M., Skehel J. J., Waterfield M. D., Smith A. E. In vitro synthesis, glycosylation, and membrane insertion of influenza virus haemagglutinin // *Virology*. – 1979. – V. 95. – № 2. – P. 343–350.
128. El-Shesheny R., Barman S., Feeroz M. M., Hasan M. K., Jones-Engel L., Franks J., Turner J., Seiler P., Walker D., Friedman K., Kercher L., Begum S., Akhtar S., Datta A. K., Krauss S., Kayali G., McKenzie P., Webby R. J., Webster R. G. Genesis of influenza A(H5N8) viruses // *Emerging Infectious Diseases*. – 2017. – V. 23. – № 8. – P. 1368–1371.
129. Fablet C., Simon G., Dorenlor V., Eono F., Eveno E., Gorin S., Quéguiner S., Madec F., Rose N. Different herd level factors associated with

- H1N1 or H1N2 influenza virus infections in fattening pigs // Preventive Veterinary Medicine. – 2013. – V. 112. – № 3–4. – P. 257–265.
130. Fan S., Zhou L., Wu D., Gao X., Pei E., Wang T., Gao Y., Xia X. A novel highly pathogenic H5N8 avian influenza virus isolated from a wild duck in China // Influenza and other Respiratory Viruses. – 2014. – V. 8. – № 6. – P. 646–653.
131. Fereidouni S. R., Starick E., Beer M., Wilking H., Kalthoff D., Grund C., Häuslaigner R., Breithaupt A., Lange E., Harder T. C. Highly pathogenic avian influenza virus infection of mallards with homo- and heterosubtypic immunity induced by low pathogenic avian influenza viruses // PLoS ONE. – 2009. – V. 4. – № 8.
132. Ferro P. J., Budke C. M., Peterson M. J., Cox D., Roltsch E., Merendino T., Nelson M., Lupiani B. Multiyear surveillance for avian influenza virus in waterfowl from wintering grounds, Texas Coast, USA // Emerging Infectious Diseases. – 2010. – V. 16. – № 8. – P. 1224–1230.
133. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Chinese-origin H7N9 avian influenza spread in poultry and human exposure – Qualitative risk assessment update. FAO Animal Health Risk Analysis. – Assessment № 4. – Rome: FAO, 2018. – 16 p. – Текст : электронный. – URL: <http://www.fao.org/3/i8705en/I8705EN.PDF> (дата обращения: 05.09.2020).
134. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. H7N9 situation update – 5 September 2018. – Rome: FAO, 2018. – Текст : электронный. – URL: [http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/h7n9/situation\\_update.html](http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/h7n9/situation_update.html) (дата обращения: 05.09.2020).
135. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Approaches to Controlling, Preventing and Eliminating H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza in Endemic Countries. – V. 171. – Rome: FAO, 2011. – 97 p. – Текст : электронный. – URL:

[www.fao.org/docrep/014/i2150e/i2150e00.htm](http://www.fao.org/docrep/014/i2150e/i2150e00.htm) (дата обращения: 05.09.2020).

136. Fortes P., Beloso A., Ortín J. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport // *EMBO Journal*. – 1994. – V. 13. – № 3. – P. 704–712.
137. Freidl G. S., Meijer A., de Bruin E., de Nardi M., Munoz O., Capua I., Breed A. C., Harris K., Hill A., Kosmider R., Banks J., von Dobschuetz S., Stark K., Wieland B., Stevens K., van der Werf S., Enouf V., van der Meulen K., Van Reeth K., Dauphin G., Koopmans M. Influenza at the animal-human interface: A review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1) // *Eurosurveillance*. – 2014. – V. 19. – № 18.
138. Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses / A. Gaymard, Le N, E. Frobert [и др.]. — Текст : непосредственный // *Clinical Microbiology and Infection*. — 2016. — № 22(12). — С. 975-983.
139. Fusaro A., Monne I., Mulatti P., Zecchin B., Bonfanti L., Ormelli S., Milani A., Cecchetti K., Lemey P., Moreno A., Massi P., Dorotea T., Marangon S., Terregino C. Genetic diversity of highly pathogenic avian influenza A(H5N8/H5N5) viruses in Italy, 2016–17 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2017. – V. 23. – № 9. – P. 1543–1547.
140. Gaidet N., Ould El Mamy A. B., Cappelle J., Caron A., Cumming G. S., Grosbois V., Gil P., Hammoumi S., de Almeida R. S., Fereidouni S. R., Cattoli G., Abolnik C., Mundava J., Fofana B., Ndlovu M., Diawara Y., Hurtado R., Newman S. H., Dodman T., Balança G. Investigating avian influenza infection hotspots in old-world shorebirds // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – № 9.
141. Gao R. B., Cao B., Hu Y. W., Feng Z. J., Wang D. Y., Hu W. F., Chen J., Jie Z. J., Qiu H. B., Xu K., Xu X. W., Lu H. Z., Zhu W. F., Gao Z. C., Xiang N. J., Shen Y. Z., He Z. B., Gu Y., Zhang Z. Y., Yang Y., Zhao X.,

- Zhou L., Li X. D., Zou S. M., Zhang Y., Li X. Y., Yang L., Guo J. F., Dong J., Li Q., Dong L. B., Zhu Y., Bai T., Wang S. W., Hao P., Yang W. Z., Zhang Y. P., Han J., Yu H. J., Li D. X., Gao G. F., Wu G. Z., Wang Y., Yuan Z. H., Shu Y. L. Human Infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus // *New England Journal of Medicine*. – 2013. – V. 368. – № 20. – P. 1888–1897.
142. Garamszegi L. Z., Møller A. P. Prevalence of avian influenza and host ecology // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2007. – V. 274. – № 1621. – P. 2003–2012.
143. García M., Suarez D. L., Crawford J. M., Latimer J. W., Slemons R. D., Swayne D. E., Perdue M. L. Evolution of H5 subtype avian influenza A viruses in North America // *Virus Research*. – 1997. – V. 51. – № 2. – P. 115–124.
144. Gauthier-Clerc M., Lebarbenchon C., Thomas F. Recent expansion of highly pathogenic avian influenza H5N1: A critical review // *Ibis*. – 2007. – V. 149. – № 2. – P. 202–214.
145. Gilbert M., Pfeiffer D. U. Risk factor modelling of the spatio-temporal patterns of highly pathogenic avian influenza (HPAIV) H5N1: A review // *Spatial and Spatio-temporal Epidemiology*. – 2012. – V. 3. – № 3. – P. 173–183.
146. Globig A., Starick E., Homeier T., Pohlmann A., Grund C., Wolf P., Zimmermann A., Wolf C., Heim D., Schlößer H., Zander S., Beer M., Conraths F. J., Harder T. C. Epidemiological and molecular analysis of an outbreak of highly pathogenic avian influenza H5N8 clade 2.3.4.4 in a German zoo: Effective disease control with minimal culling // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2017. – V. 64. – № 6. – P. 1813–1824.
147. Gonzales J. L., Stegeman J. A., Koch G., de Wit S. J., Elbers A. R. W. Rate of introduction of a low pathogenic avian influenza virus infection in different poultry production sectors in the Netherlands // *Influenza and other Respiratory Viruses*. – 2013. – V. 7. – № 1. – P. 6–10.

148. González-Reiche A. S., Morales-Betoulle M. E., Alvarez D., Betoulle J. L., Müller M. L., Sosa S. M., Perez D. R. Influenza A viruses from wild birds in Guatemala belong to the North American lineage // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – № 3.
149. Gorman O. T., Bean W. J., Kawaoka Y., Webster R. G. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus // *Journal of Virology*. – 1990. – V. 64. – № 4. – P. 1487–1497.
150. Graves I. L. Influenza viruses in birds of the Atlantic flyway // *Avian Diseases*. – 1992. – V. 36. – № 1. – P. 1–10.
151. Gray G. C., McCarthy T., Capuano A. W., Setterquist S. F., Olsen C. W., Alavanja M. C., Lynch C. F. Swine workers and swine influenza virus infections // *Emerging Infectious Diseases*. – 2007. – V. 13. – № 12. – P. 1871–1878.
152. Gu M., Liu W., Cao Y., Peng D., Wang X., Wan H., Zhao G., Xu Q., Zhang W., Song Q., Li Y., Liu X. Novel reassortant highly pathogenic avian influenza (H5N5) viruses in domestic ducks, China // *Emerging Infectious Diseases*. – 2011. – V. 17. – № 6. – P. 1060–1063.
153. Gu M., Zhao G., Zhao K., Zhong L., Huang J., Wan H., Wang X., Liu W., Liu H., Peng D., Liu X. Novel variants of clade 2.3.4 highly pathogenic avian influenza A(H5N1) viruses, China // *Emerging Infectious Diseases*. – 2013. – V. 19. – № 12. – P. 2021–2024.
154. Guan Y., Peiris J. S. M., Lipatov A. S., Ellis T. M., Dyrting K. C., Krauss S., Zhang L. J., Webster R. G., Shortridge K. F. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – V. 99. – № 13. – P. 8950–8955.
155. Guan Y., Shortridge K. F., Krauss S., Chin P. S., Dyrting K. C., Ellis T. M., Webster R. G., Peiris M. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China // *Journal of Virology*. – 2000. – V. 74. – № 20. – P. 9372–9380.

156. Haesebrouck F., Biront P., Pensaert M. B., Leunen J. Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease // *American Journal of Veterinary Research*. – 1985. – V. 46. – № 9. – P. 1926–1928.
157. Haesebrouck F., Pensaert M. B. Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunised with an inactivated influenza H1N1 vaccine // *Veterinary Microbiology*. – 1986. – V. 11. – № 3. – P. 239–249.
158. Halvorson D. A. A Minnesota cooperative control program // *Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza (3–5 September 1986, Athens, United States)*. – Athens: US Animal Health Association, 1987. – P. 327–336.
159. Halvorson D. A. Avian influenza control in Minnesota // *Poultry Digest*. – 1995. – V. 54. – P. 12–19.
160. Halvorson D. A. Epidemiology and control of avian influenza in Minnesota // *Proceedings of the 47th New England Poultry Health Conference (25–26 March 1998, Portsmouth, Great Britain)*. – Portsmouth: New England Poultry Association, 1998. – P. 5–11.
161. Harris M. T., Brown J. D., Goekjian V. H., Luttrell M. P., Poulson R. L., Wilcox B. R., Swayne D. E., Stallknecht D. E. Canada geese and the epidemiology of avian influenza viruses // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2010. – V. 46. – № 3. – P. 981–987.
162. Hause B. M., Collin E. A., Liu R., Huang B., Sheng Z., Lu W., Wang D., Nelson E. A., Li F. Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: Proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family // *mBio*. – 2014. – V. 5. – № 2.
163. Hay A. J. The action of adamantanamines against influenza A viruses: Inhibition of the M2 ion channel protein // *Seminars in Virology*. – 1992. – V. 3. – P. 21–30.

164. Hay A. J., Abraham G., Skehel J. J., Smith J. C., Fellner P. Influenza virus messenger RNAs are incomplete transcripts of the genome RNAs // *Nucleic Acids Research*. – 1977. – V. 4. – № 12. – P. 4197–4209.
165. Hay A. J., Lomniczi B., Bellamy A. R., Skehel J. J. Transcription of the influenza virus genome // *Virology*. – 1977. – V. 83. – № 2. – P. 337–355.
166. Hay A. J., Skehel J. J., McCauley J. Characterization of influenza virus RNA complete transcripts // *Virology*. – 1982. – V. 116. – № 2. – P. 517–522.
167. He S., Shi J., Qi X., Huang G., Chen H., Lu C. Lethal infection by a novel reassortant H5N1 avian influenza A virus in a zoo-housed tiger // *Microbes and Infection*. – 2015. – V. 17. – № 1. – P. 54–61.
168. Heinen P. P., De Boer-Luijtz E. A., Bianchi T. J. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection // *Journal of General Virology*. – 2001. – V. 82. – № 11. – P. 2697–2707.
169. Heinen P. P., Rijsewijks F. A., de Boer-Luitjtze E. A., Bianchi A. T. J. Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2-nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus // *Journal of General Virology*. – 2002. – V. 83. – № 8. – P. 1851–1859.
170. Heinen P. P., Van Nieuwstadt A. P., De Boer-Luijtz E. A., Bianchi A. T. J. Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2001. – V. 82. – № 1–2. – P. 39–56.
171. Helenius A. Unpacking the incoming influenza virus // *Cell*. – 1992. – V. 69. – № 4. – P. 577–578.
172. Herfst S., Schrauwen E. J. A., Linster M., Chutinimitkul S., De Wit E., Munster V. J., Sorrell E. M., Bestebroer T. M., Burke D. F., Smith D. J., Rimmelzwaan G. F., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets // *Science*. – 2012. – V. 336. – № 6088. – P. 1534–1541.

173. Herz C., Stavnezer E., Krug R. M., Gurney Jr T. Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells // *Cell*. – 1981. – V. 26. – № 3. – P. 391–400.
174. Hill N. J., Hussein I. T. M., Davis K. R., Ma E. J., Spivey T. J., Ramey A. M., Puryear W. B., Das S. R., Halpin R. A., Lin X., Fedorova N. B., Suarez D. L., Boyce W. M., Runstadler J. A. Reassortment of influenza A viruses in wild birds in Alaska before H5N1 clade 2.3.4.4 outbreaks // *Emerging Infectious Diseases*. – 2017. – V. 23. – № 4. – P. 654–657.
175. Hill N. J., Takekawa J. Y., Ackerman J. T., Hobson K. A., Herring G., Cardona C. J., Runstadler J. A., Boyce W. M. Migration strategy affects avian influenza dynamics in mallards (*Anas platyrhynchos*) // *Molecular Ecology*. – 2012. – V. 21. – № 24. – P. 5986–5999.
176. Hill N. J., Takekawa J. Y., Cardona C. J., Ackerman J. T., Schultz A. K., Spragens K. A., Boyce W. M. Waterfowl ecology and avian influenza in California: Do host traits inform us about viral occurrence? // *Avian Diseases*. – 2010. – V. 54. – Suppl. 1. – P. 426–432.
177. Hill N. J., Takekawa J. Y., Cardona C. J., Meixell B. W., Ackerman J. T., Runstadler J. A., Boyce W. M. Cross-seasonal patterns of avian influenza virus in breeding and wintering migratory birds: A flyway perspective // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. – 2012. – V. 12. – № 3. – P. 243–253.
178. Hill S. C., Lee Y. J., Song B. M., Kang H. M., Lee E. K., Hanna A., Gilbert M., Brown I. H., Pybus O. G. Wild waterfowl migration and domestic duck density shape the epidemiology of highly pathogenic H5N8 influenza in the Republic of Korea // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2015. – V. 34. – P. 267–277.
179. Hinshaw V. S., Air G. M., Gibbs A. J., Graves L., Prescott B., Karunakaran D. Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls // *Journal of Virology*. – 1982. – V. 42. – № 3. – P. 865–872.

180. Hinshaw V. S., Webster R. G., Easterday B. C., Bean Jr W. J. Replication of avian influenza A viruses in mammals // *Infection and Immunity*. – 1981. – V. 34. – № 2. – P. 354–361.
181. Hirota Y., Kaji M., Ide S., Kajiwara J., Kataoka K., Goto S., Oka T. Antibody efficacy as a keen index to evaluate influenza vaccine effectiveness // *Vaccine*. – 1997. – V. 15. – № 9. – P. 962–967.
182. Hirst G. K. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus // *Science*. – 1941. – V. 94. – № 2427. – P. 22–23.
183. Horimoto T., Rivera E., Pearson J., Senne D., Krauss S., Kawaoka Y., Webster R. G. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico // *Virology*. – 1995. – V. 213. – № 1. – P. 223–230.
184. Hoyer B. J., Munster V. J., Nishiura H., Fouchier R. A. M., Madsen J., Klaassen M. Reconstructing an annual cycle of interaction: Natural infection and antibody dynamics to avian influenza along a migratory flyway // *Oikos*. – 2011. – V. 120. – № 5. – P. 748–755.
185. Hoyer B. J., Munster V. J., Nishiura H., Klaassen M., Fouchier R. A. M. Surveillance of wild birds for avian influenza virus // *Emerging Infectious Diseases*. – 2010. – V. 16. – № 12. – P. 1827–1834.
186. Hu Y., Liu X., Li S., Guo X., Yang Y., Jin M. Complete genome sequence of a novel H4N1 influenza virus isolated from a pig in central china // *Journal of Virology*. – 2012. – V. 86. – № 24. – P. 13879.
187. Huang K., Zhu H., Fan X., Wang J., Cheung C. L., Duan L., Hong W., Liu Y., Li L., Smith D. K., Chen H., Webster R. G., Webby R. J., Peiris M., Guan Y. Establishment and lineage replacement of h6 influenza viruses in domestic ducks in southern china // *Journal of Virology*. – 2012. – V. 86. – № 11. – P. 6075–6083.
188. Hull J. D., Gilmore R., Lamb R. A. Integration of a small integral membrane protein, M2, of influenza virus into the endoplasmic reticulum:

- Analysis of the internal signal-anchor domain of a protein with an ectoplasmic NH<sub>2</sub> terminus // *Journal of Cell Biology*. – 1988. – V. 106. – № 5. – P. 1489–1498.
189. Hussain M., Galvin H. D., Haw T. Y., Nutsford A. N., Husain M. Drug resistance in influenza A virus: The epidemiology and management // *Infection and Drug Resistance*. – 2017. – V. 10. – P. 121–134.
190. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus / M. Linster, B. S. van, G. M. de [и др.]. — Текст : непосредственный // *Cell*. — 2014. — № 157. — С. 329–339.
191. Identification of mammalian-adapting mutations in the polymerase complex of an avian H5N1 influenza virus / AS Taft, M. Ozawa, A. Fitch [и др.]. — Текст : непосредственный // *Nat Commun*. — 2015. — № 6. — С. 7491.
192. Iftimovici R., Iacobescu V., Petrescu A., Muțiu A., Chelaru M. Isolation of influenza virus A/USSR 90/77 (H1N1) from wild birds // *Revue Roumaine de Medecine – Serie de Virologie*. – 1980. – V. 31. – № 3. – P. 243.
193. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S. C., Ozawa M., Shinya K., Zhong G., Hanson A., Katsura H., Watanabe S., Li C., Kawakami E., Yamada S., Kiso M., Suzuki Y., Maher E. A., Neumann G., Kawaoka Y. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets // *Nature*. – 2012. – V. 486. – № 7403. – P. 420–428.
194. In vitro assessment of attachment pattern and replication efficiency of H5N1 influenza A viruses with altered receptor specificity / S. Chutinimitkul, R. D. van, VJ Munster [и др.]. — Текст : непосредственный // *J Virol*. — 2010. — № 84. — С. 6825–6833.
195. Inventory of molecular markers affecting biological characteristics of avian influenza A viruses / Suttie Annika, Deng Yi-Mo, R. G. Andrew [и др.].

- Текст : непосредственный // *Virus Genes*. — 2019. — № 55(6). — С. 739–768.
196. Ip H. S., Torchetti M. K., Crespo R., Kohrs P., Debruyne P., Mansfield K. G., Baszler T., Badcoe L., Bodenstern B., Shearn-Bochsler V., Killian M. L., Pedersen J. C., Hines N., Gidlewski T., Deliberto T., Sleeman J. M. Novel Eurasian highly pathogenic avian influenza A H5 viruses in wild birds, Washington, USA, 2014 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2015. – V. 21. – № 5. – P. 886–890.
197. Jagger B. W., Wise H. M., Kash J. C., Walters K. A., Wills N. M., Xiao Y. L., Dunfee R. L., Schwartzman L. M., Ozinsky A., Bell G. L., Dalton R. M., Lo A., Efstathiou S., Atkins J. F., Firth A. E., Taubenberger J. K., Digard P. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response // *Science*. – 2012. – V. 337. – № 6091. – P. 199–204.
198. Jeong J., Kang H. M., Lee E. K., Song B. M., Kwon Y. K., Kim H. R., Choi K. S., Kim J. Y., Lee H. J., Moon O. K., Jeong W., Choi J., Baek J. H., Joo Y. S., Park Y. H., Lee H. S., Lee Y. J. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N8) in domestic poultry and its relationship with migratory birds in South Korea during 2014 // *Veterinary Microbiology*. – 2014. – V. 173. – № 3–4. – P. 249–257.
199. Jung M. A., Nelson D. I. Outbreaks of avian influenza A (H5N2), (H5N8), and (H5N1) among birds – United States, December 2014–January 2015 // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2015. – V. 64. – № 4. – P. 111.
200. Jiao P., Song Y., Huang J., Xiang C., Cui J., Wu S., Qu N., Wang N., Ouyang G., Liao M. H7N9 avian influenza virus is efficiently transmissible and induces an antibody response in chickens // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – V. 9.
201. Jiao P., Wei L., Yuan R., Gong L., Cao L., Song Y., Luo K., Ren T., Liao M. Complete genome sequence of an H5N2 avian influenza virus

- isolated from a parrot in Southern China // *Journal of Virology*. – 2012. – V. 86. – № 16. – P. 8890–8891.
202. Jo S. K., Kim H. S., Cho S. W., Seo S. H. Pathogenesis and inflammatory responses of swine H1N2 influenza viruses in pigs // *Virus Research*. – 2007. – V. 129. – № 1. – P. 64–70.
203. Joob B., Viroj W. H5N6 influenza virus infection, the newest influenza // *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. – 2015. – V. 5. – № 6. – P. 434–437.
204. Jourdain E., Gunnarsson G., Wahlgren J., Latorre-Margalef N., Bröjer C., Sahlin S., Svensson L., Waldenström J., Lundkvist Å., Olsen B. Influenza virus in a natural host, the mallard: Experimental infection data // *PLoS ONE*. – 2010. – V. 5. – № 1.
205. Jung K., Chae C. Expression of Mx protein and interferon- $\alpha$  in pigs experimentally infected with swine influenza virus // *Veterinary Pathology*. – 2006. – V. 43. – № 2. – P. 161–167.
206. Jung K., Ha Y., Chae C. Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs // *Journal of Comparative Pathology*. – 2005. – V. 132. – № 2–3. – P. 179–184.
207. Kang Y., Liu L., Feng M., Yuan R., Huang C., Tan Y., Gao P., Xiang D., Zhao X., Li Y., Irwin D. M., Shen Y., Ren T. Highly pathogenic H5N6 influenza A viruses recovered from wild birds in Guangdong, southern China, 2014–2015 // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7.
208. Kaplan B. S., Torchetti M. K., Lager K. M., Webby R. J., Vincent A. L. Absence of clinical disease and contact transmission of HPAI H5NX clade 2.3.4.4 from North America in experimentally infected pigs // *Influenza and other Respiratory Viruses*. – 2017. – V. 11. – № 5. – P. 464–470.
209. Karasin A. I., Schutten M. M., Cooper L. A., Smith C. B., Subbarao K., Anderson G. A., Carman S., Olsen C. W. Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977–1999: Evidence

- for wholly human and reassortant virus genotypes // *Virus Research*. – 2000. – V. 68. – № 1. – P. 71–85.
210. Karasin A. I., West K., Carman S., Olsen C. W. Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – V. 42. – № 9. – P. 4349–4354.
211. Kawaoka Y., Chambers T. M., Sladen W. L., Gwebster R. Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? // *Virology*. – 1988. – V. 163. – № 1. – P. 247–250.
212. Khomenko S., Abolnik C., Roberts L., Waller L., Shaw K., Monne I., Taylor J., Dhingra M., Pittiglio C., Mugyeom M., Roche X., Fredrick K., Kamata A., Okuthe S., Kone P., Wiersma L., Von Dobschuetz S., Soumare B., Makonnen Y., Morzaria S., Lubroth J. 2016–2018 Spread of H5N8 highly pathogenic avian influenza (HPAI) in sub-Saharan Africa: Epidemiological and ecological observations // *Focus On*. – 2018. – № 12. – P. 1–20.
213. Kilpatrick A. M., Chmura A. A., Gibbons D. W., Fleischer R. C., Marra P. P., Daszak P. Predicting the global spread of H5N1 avian influenza // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – V. 103. – № 51. – P. 19368–19373.
214. Kim Y. I., Park S. J., Kwon H. I., Kim E. H., Si Y. J., Jeong J. H., Lee I. W., Nguyen H. D., Kwon J. J., Choi W. S., Song M. S., Kim C. J., Choi Y. K. Genetic and phylogenetic characterizations of a novel genotype of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N8 viruses in 2016/2017 in South Korea // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2017. – V. 53. – P. 56–67.
215. Kim Y. I., Pascua P. N. Q., Kwon H. I., Lim G. J., Kim E. H., Yoon S. W., Park S. J., Kim S. M., Choi E. J., Si Y. J., Lee O. J., Shim W. S., Kim S. W., Mo I. P., Bae Y., Lim Y. T., Sung M. H., Kim C. J., Webby R. J., Webster R. G., Choi Y. K. Pathobiological features of a novel, highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus // *Emerging Microbes and Infections*. – 2014. – V. 3. – № 10.

216. Kirkland P. D., Finlaison D. S., Crispe E., Hurt A. C. Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia // *Emerging Infectious Diseases*. – 2010. – V. 16. – № 4. – P. 699–702.
217. Koehler A. V., Pearce J. M., Flint P. L., Franson J. C., Ip H. S. Genetic evidence of intercontinental movement of avian influenza in a migratory bird: The northern pintail (*Anas acuta*) // *Molecular Ecology*. – 2008. – V. 17. – № 21. – P. 4754–4762.
218. Koen J. S. A practical method for field diagnosis of swine disease // *American Journal of Veterinary Medicine*. – 2019. – V. 14. – P. 468–470.
219. Koopmans M., Wilbrink B., Conyn M., Natrop G., Van Der Nat H., Vennema H., Meijer A., Van Steenbergen J., Fouchier R., Osterhaus A., Bosman A. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands // *The Lancet*. – 2004. – V. 363. – № 9409. – P. 587–593.
220. Koppel Z., Vrtiak J., Vasil M., Spiesz St. Mass illness of ducklings in Eastern Slovakia with clinical picture of infectious sinusitis // *Veterinaria*. – 1956. – V. 6. – P. 267–268.
221. Krammer F., Smith G. J. D., Fouchier R. A. M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P. C., Palese P., Shaw M. L., Treanor J., Webster R. G., García-Sastre A. Influenza // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2018. – V. 4. – № 1. – P. 4.
222. Krauss S., Stucker K. M., Schobel S. A., Danner A., Friedman K., Knowles J. P., Kayali G., Niles L. J., Dey A. D., Raven G., Pryor P., Lin X., Das S. R., Stockwell T. B., Wentworth D. E., Webster R. G. Long-term surveillance of H7 influenza viruses in American wild aquatic birds: Are the H7N3 influenza viruses in wild birds the precursors of highly pathogenic strains in domestic poultry? // *Emerging Microbes and Infections*. – 2015. – V. 4. – № 6.
223. Krauss S., Walker D., Pryor S. P., Niles L., Chenghong L., Hinshaw V. S., Webster R. G. Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North

- America // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. – 2004. – V. 4. – № 3. – P. 177–189.
224. Krueger W. S., Gray G. C. Swine influenza virus infections in man // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2013. – V. 370. – P. 201–225.
225. Krug R. M., Alonso-Caplen F. V., Julkunen I., Katze M. G. Expression and replication of the influenza virus genome / *The Influenza Viruses*. – Boston: Springer US, 1989. – P. 89–152.
226. Krug R. M., Broni B. A., Bouloy M. Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? // *Cell*. – 1979. – V. 18. – № 2. – P. 329–334.
227. Ku K. B., Park E. H., Yum J., Kim J. A., Oh S. K., Seo S. H. Highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus from Waterfowl, South Korea, 2014 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – V. 20. – № 9. – P. 1587–1588.
228. Kucharski A. J., Mills H. L., Donnelly C. A., Riley S. Transmission potential of influenza A(H7N9) virus, China, 2013–2014 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2015. – V. 21. – № 5. – P. 852–855.
229. Kuiken T. Is low pathogenic avian influenza virus virulent for wild waterbirds? // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2013. – V. 280. – № 1763.
230. Lam T. T. Y., Ip H. S., Ghedin E., Wentworth D. E., Halpin R. A., Stockwell T. B., Spiro D. J., Dusek R. J., Bortner J. B., Hoskins J., Bales B. D., Yparraguirre D. R., Holmes E. C. Migratory flyway and geographical distance are barriers to the gene flow of influenza virus among North American birds // *Ecology Letters*. – 2012. – V. 15. – № 1. – P. 24–33.
231. Lam T. T. Y., Wang J., Shen Y., Zhou B., Duan L., Cheung C. L., Ma C., Lycett S. J., Leung C. Y. H., Chen X., Li L., Hong W., Chai Y., Zhou L., Liang H., Ou Z., Liu Y., Farooqui A., Kelvin D. J., Poon L. L. M., Smith D. K., Pybus O. G., Leung G. M., Shu Y., Webster R. G., Webby R. J., Peiris J.

- S. M., Rambaut A., Zhu H., Guan Y. The genesis and source of the H7N9 influenza viruses causing human infections in China // *Nature*. – 2013. – V. 502. – № 7470. – P. 241–244.
232. Lam T. T. Y., Zhou B., Wang J., Chai Y., Shen Y., Chen X., Ma C., Hong W., Chen Y., Zhang Y., Duan L., Chen P., Jiang J., Zhang Y., Li L., Poon L. L. M., Webby R. J., Smith D. K., Leung G. M., Peiris J. S. M., Holmes E. C., Guan Y., Zhu H. Dissemination, divergence and establishment of H7N9 influenza viruses in China // *Nature*. – 2015. – V. 522. – № 7554. – P. 102–105.
233. Lamb R. A., Holsinger L. J., Pinto L. H. The influenza A virus M2 ion channel protein and its role in the influenza virus life cycle / Receptor-mediated virus entry into cells. – New York: Cold Spring Harbor Press, 1994. – P. 303–321.
234. Lebarbenchon C., Sreevatsan S., Ramakrishnan M. A., Poulson R., Goekjian V., Di Matteo J. J., Wilcox B., Stallknecht D. E. Influenza A viruses in American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*) // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2010. – V. 46. – № 4. – P. 1284–1289.
235. Lebarbenchon C., Wilcox B. R., Poulson R. L., Slusher M. J., Fedorova N. B., Katzel D. A., Cardona C. J., Knutsen G. A., Wentworth D. E., Stallknecht D. E. Isolation of type A influenza viruses from red-necked grebes (*Podiceps grisegena*) // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2015. – V. 51. – № 1. – P. 290–293.
236. Lee B. W., Bey R. F., Baarsch M. J., Larson M. E. Class specific antibody response to influenza A H1N1 infection in swine // *Veterinary Microbiology*. – 1995. – V. 43. – № 2–3. – P. 241–250.
237. Lee C. W., Senne D. A., Linares J. A., Woolcock P. R., Stallknecht D. E., Spackman E., Swayne D. E., Suarez D. L. Characterization of recent H5 subtype avian influenza viruses from US poultry // *Avian Pathology*. – 2004. – V. 33. – № 3. – P. 288–297.

238. Lee C. W., Senne D. A., Suarez D. L. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus // *Journal of Virology*. – 2004. – V. 78. – № 15. – P. 8372–8381.
239. Lee C. W., Suarez D. L. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination // *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. – 2005. – V. 6. – № 1. – P. 1–15.
240. Lee D. H., Bertran K., Kwon J. H., Swayne D. E. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4 // *Journal of Veterinary Science*. – 2017. – V. 18. – P. 269–280.
241. Lee D. H., Sharshov K., Swayne D. E., Kurskaya O., Sobolev I., Kabilov M., Alekseev A., Irza V., Shestopalov A. Novel reassortant clade 2.3.4.4 avian influenza A(H5N8) virus in wild aquatic Birds, Russia, 2016 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2017. – V. 23. – № 2. – P. 358–360.
242. Lee D. H., Torchetti M. K., Winker K., Ip H. S., Song C. S., Swayne D. E. Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds // *Journal of Virology*. – 2015. – V. 89. – № 12. – P. 6521–6524.
243. Lee J. H., Gramer M. R., Joo H. S. Efficacy of swine influenza A virus vaccines against an H3N2 virus variant // *Canadian Journal of Veterinary Research*. – 2007. – V. 71. – № 3. – P. 207–212.
244. Lee M. S., Chen L. H., Chen Y. P., Liu Y. P., Li W. C., Lin Y. L., Lee F. Highly pathogenic avian influenza viruses H5N2, H5N3, and H5N8 in Taiwan in 2015 // *Veterinary Microbiology*. – 2016. – V. 187. – P. 50–57.
245. Lee Y. J., Kang H. M., Lee E. K., Song B. M., Jeong J., Kwon Y. K., Kim H. R., Lee K. J., Hong M. S., Jang I., Choi K. S., Kim J. Y., Lee H. J., Kang M. S., Jeong O. M., Baek J. H., Joo Y. S., Park Y. H., Lee H. S. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – V. 20. – № 6. – P. 1087–1089.

246. Lemey P., Rambaut A., Drummond A. J., Suchard M. A. Bayesian phylogeography finds its roots // *PLoS Computational Biology*. – 2009. – V. 5. – № 9.
247. Length variations in the NA stalk of an H7N1 influenza virus have opposite effects on viral excretion in chickens and ducks / TW Hoffmann, S. Munier, T. Larcher [и др.]. — Текст : непосредственный // *J Virol*. — 2012. — № 86. — С. 584–588.
248. Lewis N. S., Anderson T. K., Kitikoon P., Skepner E., Burke D. F., Vincent A. L. Substitutions near the hemagglutinin receptor-binding site determine the antigenic evolution of influenza A H3N2 viruses in U.S. Swine // *Journal of Virology*. – 2014. – V. 88. – № 9. – P. 4752–4763.
249. Lewis N. S., Javakhishvili Z., Russell C. A., Machablishvili A., Lexmond P., Verhagen J. H., Vuong O., Onashvili T., Donduashvili M., Smith D. J., Fouchier R. A. M. Avian influenza virus surveillance in wild birds in Georgia: 2009–2011 // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – № 3.
250. Li K. S., Guan Y., Wang J., Smith G. J. D., Xu K. M., Duan L., Rahardjo A. P., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T. D., Estoepangestie A. T. S., Chaisingh A., Auewarakui P., Long H. T., Hanh N. T. H., Webby R. J., Poon L. L. M., Chen H., Shortridge K. F., Yuen K. Y., Webster R. G., Peiris J. S. M. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia // *Nature*. – 2004. – V. 430. – № 6996. – P. 209–213.
251. Li M., Liu H., Bi Y., Sun J., Wong G., Liu D., Li L., Liu J., Chen Q., Wang H., He Y., Shi W., Gao G. F., Chen J. Highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus in wild migratory birds, Qinghai Lake, China // *Emerging Infectious Diseases*. – 2017. – V. 23. – № 4. – P. 637–641.
252. Li Q., Wang X., Gao Z., Sun Z., Cui Z., Duan Z., Li J., Gu M., Wang X., Hu J., Liu X., Liu X. Novel reassortant H5N5 viruses bind to a human-type receptor as a factor in pandemic risk // *Veterinary Microbiology*. – 2015. – V. 175. – № 2–4. – P. 356–361.

253. Li S., Schulman J., Itamura S., Palese P. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus // *Journal of Virology*. – 1993. – V. 67. – № 11. – P. 6667–6673.
254. Lipkind M., Weisman Y., Shihmanter E., Shoham D. Review of the three-year studies on the ecology of avian influenza viruses in Israel // *Proceedings of the First International Symposium on Avian Influenza (22–24 April 1981, Beltsville, United States)*. – Richmond: Carter Composition, 1981. – P. 69–78.
255. Liu C. G., Liu M., Liu F., Lv R., Liu D. F., Qu L. D., Zhang Y. Emerging multiple reassortant H5N5 avian influenza viruses in ducks, China, 2008 // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – V. 167. – № 3–4. – P. 296–306.
256. Liu D., Shi W., Shi Y., Wang D., Xiao H., Li W., Bi Y., Wu Y., Li X., Yan J., Liu W., Zhao G., Yang W., Wang Y., Ma J., Shu Y., Lei F., Gao G. F. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: Phylogenetic, structural, and coalescent analyses // *The Lancet*. – 2013. – V. 381. – № 9881. – P. 1926–1932.
257. Lorusso A., Vincent A. L., Harland M. L., Alt D., Bayles D. O., Swenson S. L., Gramer M. R., Russell C., Smith D. J., Lager K. M., Lewis N. S. Genetic and antigenic characterization of H1 influenza viruses from United States swine from 2008 // *Journal of General Virology*. – 2011. – V. 92. – № 4. – P. 919–930.
258. Loving C. L., Lager K. M., Vincent A. L., Brockmeier S. L., Gauger P. C., Anderson T. K., Kitikoon P., Perez D. R., Kehrli Jr M. E. Efficacy in pigs of inactivated and live attenuated influenza virus vaccines against infection and transmission of an emerging H3N2 similar to the 2011–2012 H3N2v // *Journal of Virology*. – 2013. – V. 87. – № 17. – P. 9895–9903.
259. Lowen A. C., Mubareka S., Steel J., Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature // *PLoS Pathogens*. – 2007. – V. 3. – № 10. – P. 1470–1476.

260. Lu L., Leigh Brown A. J., Lycett S. J. Quantifying predictors for the spatial diffusion of avian influenza virus in China // *BMC Evolutionary Biology*. – 2017. – V. 17. – № 1.
261. Lu L., Lycett S. J., Brown A. J. L. Determining the phylogenetic and phylogeographic origin of highly pathogenic avian influenza (H7N3) in Mexico // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9. – № 9.
262. Lush D. The chick red cell agglutination test with the Newcastle disease and fowl plague // *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. – 1942. V. 53. – P. 157–160.
263. Lvov D. K. Circulation of Influenza viruses in natural biocenoses / *Viruses and Environment*. – Ch. 18. – New York: Academic Press, 1978. – P. 351–380.
264. Lvov D. K., Kaverin N. V. Avian influenza in Northern Eurasia // *Monographs in Virology*. – 2008. – V. 27. – P. 41–58.
265. Lycett S. J., Bodewes R., Pohlmann A., Banks J., Bányai K., Boni M. F., Bouwstra R., Breed A. C., Brown I. H., Chen H., Dán A., DeLiberto T. J., Diep N., Gilbert M., Hill S., Ip H. S., Ke C. W., Kida H., Killian M. L., Koopmans M. P., Kwon J. H., Lee D. H., Lee Y. J., Lu L., Monne I., Pasick J., Pybus O. G., Rambaut A., Robinson T. P., Sakoda Y., Zohari S., Song C. S., Swayne D. E., Torchetti M. K., Tsai H. J., Fouchier R. A. M., Beer M., Woolhouse M., Kuiken T., The Global Consortium for H. N., Related Influenza V. Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8 // *Science*. – 2016. – V. 354. – № 6309. – P. 213–217.
266. Lycett S. J., Duchatel F., Digard P. A brief history of bird flu // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2019. – V. 374. – № 1775.
267. Ma L., Jin T., Wang H., Liu H., Wang R., Li Y., Yang G., Xiong Y., Chen J., Zhang J., Chen G., Li W., Liu D., Lin P., Huang Y., Gao G. F., Chen Q. Two reassortant types of highly pathogenic H5N8 avian influenza virus

- from wild birds in Central China in 2016 article // *Emerging Microbes and Infections*. – 2018. – V. 7. – № 1.
268. Ma W., Gramer M., Rossow K., Yoon K. J. Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the Midwestern United States // *Journal of Virology*. – 2006. – V. 80. – № 10. – P. 5092–5096.
269. Ma W., Vincent A. L., Gramer M. R., Brockwell C. B., Lager K. M., Janke B. H., Gauger P. C., Patnayak D. P., Webby R. J., Richt J. A. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – V. 104. – № 52. – P. 20949–20954.
270. Ma W., Vincent A. L., Lager K. M., Janke B. H., Henry S. C., Rowland R. R. R., Hesse R. A., Richt J. A. Identification and characterization of a highly virulent triple reassortant H1N1 swine influenza virus in the United States // *Virus Genes*. – 2010. – V. 40. – № 1. – P. 28–36.
271. Mackenzie J. S., Edwards E. C., Holmes R. M., Hinshaw V. S. Isolation of ortho- and paramyxoviruses from wild birds in western Australia, and the characterization of novel influenza A viruses // *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. – 1984. – V. 62. – № 1. – P. 89–99.
272. Macklin M. D., McCabe D., McGregor M. W., Neumann V., Meyer T., Callan R., Hinshaw V. S., Swain W. F. Immunization of pigs with a particle-mediated DNA vaccine to influenza A virus protects against challenge with homologous virus // *Journal of Virology*. – 1998. – V. 72. – № 2. – P. 1491–1496.
273. Makarova N. V., Kaverin N. V., Krauss S., Senne D., Webster R. G. Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America // *Journal of General Virology*. – 1999. – V. 80. – № 12. – P. 3167–3171.

274. Manrubia S. C., Escarmís C., Domingo E., Lázaro E. High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies // *Gene*. – 2005. – V. 347. – P. 273–282.
275. Manz, B. Adaptation of avian influenza A virus polymerase in mammals to overcome the host species barrier. / B. Manz, M. Schwemmler, L. Brunotte. — Текст : непосредственный // *J Virol*. — 2013. — № 87. — С. 7200–7209.
276. Marangon S., Capua I. Control of avian influenza in Italy: From stamping out to emergency and prophylactic vaccination // *Developments in Biologicals*. – 2006. – V. 124. – P. 109–115.
277. Marangon S., Capua I., Pozza G., Santucci U. Field experiences in the control of avian influenza outbreaks in densely populated poultry areas // *Developments in Biologicals*. – 2005. – V. 119. – P. 155–164.
278. Martin V., Pfeiffer D. U., Zhou X., Xiao X., Prosser D. J., Guo F., Gilbert M. Spatial distribution and risk factors of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 in China // *PLoS Pathogens*. – 2011. – V. 7. – № 3.
279. Mastin A., Alarcon P., Pfeiffer D., Wood J., Williamson S., Brown I., Wieland B. Prevalence and risk factors for swine influenza virus infection in the English pig population // *PLoS Currents*. – 2011.
280. Matsuzaki Y., Sugawara K., Mizuta K., Tsuchiya E., Muraki Y., Hongo S., Suzuki H., Nakamura K. Antigenic and genetic characterization of influenza C viruses which caused two outbreaks in Yamagata City, Japan, in 1996 and 1998 // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002. – V. 40. – № 2. – P. 422–429.
281. Maxted A. M., Page Luttrell M., Goekjian V. H., Brown J. D., Niles L. J., Dey A. D., Kalasz K. S., Swayne D. E., Stallknecht D. E. Avian influenza virus infection dynamics in shorebird hosts // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2012. – V. 48. – № 2. – P. 322–334.
282. Millman A. J., Havers F., Iuliano A. D., Davis C. T., Sar B., Sovann L., Chin S., Corwin A. L., Vongphrachanh P., Douangngeun B., Lindblade K. A.,

- Chittaganpitch M., Kaewthong V., Kile J. C., Nguyen H. T., Pham D. V., Donis R. O., Widdowson M. A. Detecting spread of avian influenza A(H7N9) virus beyond China // *Emerging Infectious Diseases*. – 2015. – V. 21. – № 5. – P. 741–749.
283. Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Notice of the Ministry of Agriculture on doing a good job of the autumn immunization of highly pathogenic avian influenza in the whole country. Report no. 07B130303201700282. – Beijing: Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, 2017. – Текст : электронный. – URL: [http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201707/t20170711\\_5744436.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201707/t20170711_5744436.htm) (дата обращения: 05.09.2020).
284. Monne I., Fusaro A., Nelson M. I., Bonfanti L., Mulatti P., Hughes J., Murcia P. R., Schivo A., Valastro V., Moreno A., Holmes E. C., Cattoli G. Emergence of a highly pathogenic Avian influenza virus from a low-pathogenic progenitor // *Journal of Virology*. – 2014. – V. 88. – № 8. – P. 4375–4388.
285. Monne I., Joannis T. M., Fusaro A., De Benedictis P., Lombin L. H., Ularanu H., Egbuji A., Solomon P., Obi T. U., Cattoli G., Capua I. Reassortant avian influenza virus (H5N1) in poultry, Nigeria, 2007 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2008. – V. 14. – № 4. – P. 637–640.
286. Morris R. S., Jackson R. Epidemiology of H5N1 avian influenza in Asia and implications for regional control. – Rome: FAO, 2005. – 52 p. – Текст : электронный. – URL: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/246974/aj122e00.pdf> (дата обращения: 05.09.2020).
287. Munster V. J., Baas C., Lexmond P., Waldenström J., Wallensten A., Fransson T., Rimmelzwaan G. F., Beyer W. E. P., Schutten M., Olsen B., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M. Spatial, temporal, and species

- variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds // *PLoS Pathogens*. – 2007. – V. 3. – № 5. – P. 0630–0638.
288. Mutations in the hemagglutinin and matrix genes of a virulent influenza virus variant, A/FM/1/47-MA, control different stages in pathogenesis. / CA Smeenk, KE Wright, BF Burns [и др.]. — Текст : непосредственный // *Virus Res*. — 1996. — № 44. — С. 79–95.
289. Nayak D. P., Hui E. K. W., Barman S. Assembly and budding of influenza virus // *Virus Research*. – 2004. – V. 106. – P. 147–165.
290. Nelson M. I., Gramer M. R., Vincent A. L., Holmes E. C. Global transmission of influenza viruses from humans to swine // *Journal of General Virology*. – 2012. – V. 93. – P. 2195–2203.
291. Nelson M. I., Lemey P., Tan Y., Vincent A., LamTommy T. T. Y., Detmer S., Viboud C., Suchard M. A., Rambaut A., Holmes E. C., Gramer M. Spatial dynamics of human-origin H1 influenza A virus in North American swine // *PLoS Pathogens*. – 2011. – V. 7. – № 6.
292. Nelson M. I., Wentworth D. E., Culhane M. R., Vincent A. L., Viboud C., LaPointe M. P., Lin X., Holmes E. C., Detmer S. E. Introductions and evolution of human-origin seasonal influenza A viruses in multinational swine populations // *Journal of Virology*. – 2014. – V. 88. – № 17. – P. 10110–10119.
293. Neumann G., Chen H., Gao G. F., Shu Y., Kawaoka Y. H5N1 influenza viruses: Outbreaks and biological properties // *Cell Research*. – 2010. – V. 20. – № 1. – P. 51–61.
294. Neuraminidase stalk length and additional glycosylation of the hemagglutinin influence the virulence of influenza H5N1 viruses for mice / Y. Matsuoka, DE Swayne, C. Thomas [и др.]. — Текст : непосредственный // *J Virol*. — 2009. — № 83. — С. 4704–4708.
295. Nishiura H., Hoyer B., Klaassen M., Bauer S., Heesterbeek H. How to find natural reservoir hosts from endemic prevalence in a multi-host

- population: A case study of influenza in waterfowl // *Epidemics*. – 2009. – V. 1. – № 2. – P. 118–128.
296. Nobusawa E., Aoyama T., Kato H., Suzuki Y., Tateno Y., Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses // *Virology*. – 1991. – V. 182. – № 2. – P. 475–485.
297. OIE (World Organisation for Animal Health). Avian Influenza. – 2014. – Текст : электронный. – URL: [www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf) (дата обращения: 05.09.2020).
298. Olsen B., Munster V. J., Wallensten A., Waldenström J., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M. Global patterns of influenza A virus in wild birds // *Science*. – 2006. – V. 312. – № 5772. – P. 384–388.
299. O'Neill R. E., Talon J., Palese P. The influenza virus NP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins // *EMBO Journal*. – 1998. – V. 17. – № 1. – P. 288–296.
300. Opriessnig T., Giménez-Lirola L. G., Halbur P. G. Polymicrobial respiratory disease in pigs // *Animal health research reviews*. – 2011. – V. 12. – № 2. – P. 133–148.
301. Osterhaus A. D. M. E., Rimmelzwaan G. F., Martina B. E. E., Bestebroer T. M., Fouchier R. A. M. Influenza B virus in seals // *Science*. – 2000. – V. 288. – № 5468. – P. 1051–1053.
302. Osterholm M. T., Kelley N. S. Mammalian-transmissible H5N1 influenza: Facts and perspective // *mBio*. – 2012. – V. 3. – № 2.
303. Ottis K., Bachmann P. A. Isolation and characterization of ortho- and paramyxoviruses from feral birds in Europe // *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*. – 1983. – V. 30. – № 1–10. – P. 22–35.
304. Pabbaraju K., Tellier R., Wong S., Li Y., Bastien N., Tang J. W., Drews S. J., Jang Y., Todd Davis C., Fonseca K., Tipples G. A. Full-genome analysis

- of avian influenza A(H5N1) virus from human, North America, 2013 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – V. 20. – № 5. – P. 887–891.
305. Paillot R., Hannant D., Kydd J. H., Daly J. M. Vaccination against equine influenza: Quid novi? // *Vaccine*. – 2006. – V. 24. – № 19. – P. 4047–4061.
306. Palese P., Shaw M. L. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication / Fields Virology*. – 5th edition. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. – P. 1647–1689.
307. Palese P., Tobita K., Ueda M., Compans R. W. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase // *Virology*. – 1974. – V. 61. – № 2. – P. 397–410.
308. Pantin-Jackwood M. J., Miller P. J., Spackman E., Swayne D. E., Susta L., Costa-Hurtado M., Suarez D. L. Role of poultry in the spread of novel H7N9 influenza virus in China // *Journal of Virology*. – 2014. – V. 88. – № 10. – P. 5381–5390.
309. Pasick J., Berhane Y., Joseph T., Bowes V., Hisanaga T., Handel K., Alexandersen S. Reassortant highly pathogenic influenza A H5N2 virus containing gene segments related to Eurasian H5N8 in British Columbia, Canada, 2014 // *Scientific Reports*. – 2015. – V. 5.
310. Peiris M., Yuen K. Y., Leung C. W., Chan K. H., Ip P. L. S., Lai R. W. M., Orr W. K., Shortridge K. F. Human infection with influenza H9N2 // *The Lancet*. – 1999. – V. 354. – № 9182. – P. 916–917.
311. Perdue M. L., Suarez D. L., Swayne D. E. Avian Influenza in the 1990s // *Avian and Poultry Biology Reviews*. – 2000. – V. 11. – № 1. – P. 1–20.
312. Pereda A. J., Uhart M., Perez A. A., Zaccagnini M. E., La Sala L., Decarre J., Goijman A., Solari L., Suarez R., Craig M. I., Vagnozzi A., Rimondi A., König G., Terrera M. V., Kaloghlian A., Song H., Sorrell E. M., Perez D. R. Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: Evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America // *Virology*. – 2008. – V. 378. – № 2. – P. 363–370.

313. Pereira H. G., Tůmová B., Law V. G. Avian influenza A viruses // Bulletin of the World Health Organization. – 1965. – V. 32. – № 6. – P. 855–860.
314. Pérez-Ramírez E., Gerrikagoitia X., Barral M., Höfle U. Detection of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds in Castilla-La Mancha (South Central Spain) // Veterinary Microbiology. – 2010. – V. 146. – № 3–4. – P. 200–208.
315. Petek M. Current situation in Italy // Proceedings of the First International Symposium on Avian Influenza (22–24 April 1981, Beltsville, United States). – Richmond: Carter Composition, 1981. – P. 31–34.
316. Pfitzer S., Verwoerd D. J., Gerdes G. H., Labuschagne A. E., Erasmus A., Manvell R. J., Grund C. Newcastle disease and avian influenza A virus in wild waterfowl in South Africa // Avian Diseases. – 2000. – V. 44. – № 3. – P. 655–660.
317. Plotch S. J., Bouloy M., Krug R. M. Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1979. – V. 76. – № 4. – P. 1618–1622.
318. Plotch S. J., Bouloy M., Ulmanen I., Krug R. M. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription // Cell. – 1981. – V. 23. – № 3. – P. 847–858.
319. Plotkin J. B., Dushoff J. Codon bias and frequency-dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – V. 100. – № 12. – P. 7152–7157.
320. Poljak Z., Dewey C. E., Martin S. W., Christensen J., Carman S., Friendship R. M. Prevalence of and risk factors for influenza in southern Ontario swine herds in 2001 and 2003 // Canadian Journal of Veterinary Research. – 2008. – V. 72. – № 1. – P. 7–17.

321. Pospíšil Z., Menšík J., Tůmová B., Štumpa A., Černý M. Experimental infection of colostrum-deprived, specific-pathogen free piglets with A/Hong Kong/ (H3N2) influenza virus // *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B.* – 1973. – V. 20. – № 2. – P. 139–152.
322. Poss P. E., Friendshuh K. A., Ausherman L. T. The control of avian influenza // *Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza (3–5 September 1986, Athens, United States).* – Athens: US Animal Health Association, 1987. – P. 318–326.
323. Pybus O. G., Rambaut A. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease // *Nature Reviews Genetics.* – 2009. – V. 10. – № 8. – P. 540–550.
324. Pybus O. G., Rambaut A., Belshaw R., Freckleton R. P., Drummond A. J., Holmes E. C. Phylogenetic evidence for deleterious mutation load in RNA viruses and its contribution to viral evolution // *Molecular Biology and Evolution.* – 2007. – V. 24. – № 3. – P. 845–852.
325. Qian X. Y., Alonso-Caplen F., Krug R. M. Two functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA // *Journal of Virology.* – 1994. – V. 68. – № 4. – P. 2433–2441.
326. Radostits O. M., Gay C. C., Blood D. C., Hinchcliff K. W. *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.* – 9th edition. – New York: W.B. Saunders Company, 2000.
327. Renegar K. B., Small Jr P. A., Boykins L. G., Wright P. F. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract // *Journal of Immunology.* – 2004. – V. 173. – № 3. – P. 1978–1986.
328. Richardson J. C., Akkina R. K. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells // *Archives of Virology.* – 1991. – V. 116. – № 1–4. – P. 69–80.
329. Roberts D. H. The isolation of an influenza A virus and a mycoplasma associated with duck sinusitis // *The Veterinary Record.* – 1964. – V. 76. – P. 470–473.

330. Robertson J. S., Schubert M., Lazzarini R. A. Polyadenylation sites for influenza virus mRNA // *Journal of Virology*. – 1981. – V. 38. – № 1. – P. 157–163.
331. Röhm C., Horimoto T., Kawaoka Y., Süss J., Webster R. G. Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? // *Virology*. – 1995. – V. 209. – № 2. – P. 664–670.
332. Romagosa A., Allerson M., Gramer M., Joo H., Deen J., Detmer S., Torremorell M. Vaccination of influenza A virus decreases transmission rates in pigs // *Veterinary Research*. – 2011. – V. 42. – № 1.
333. Romváry J., Mészáros J., Tanyi J., Rózsa J., Fábíán L. Influenza infectedness of captured and shot wild birds on north-eastern and south-eastern parts of Hungary // *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*. – 1976. – V. 26. – № 3. – P. 363–368.
334. Rott R., Schäfer W. Physikalisch-chemische und biologische eigenschaften des virus N und seine beziehung zur influenza A-untergruppe der myxoviren // *Zentr Veterinärmed*. – 1960. – V. 7. – P. 237–248.
335. Rowan M. K. Mass mortality among European common terns in South Africa in April–May 1961 // *British Birds*. – 1962. – V. 55. – № 3. – P. 103–114.
336. Runstadler J., Hill N., Hussein I. T. M., Puryear W., Keogh M. Connecting the study of wild influenza with the potential for pandemic disease // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2013. – V. 17. – P. 162–187.
337. Saito T., Tanikawa T., Uchida Y., Takemae N., Kanehira K., Tsunekuni R. Intracontinental and intercontinental dissemination of Asian H5 highly pathogenic avian influenza virus (clade 2.3.4.4) in the winter of 2014–2015 // *Reviews in Medical Virology*. – 2015. – V. 25. – № 6. – P. 388–405.
338. Salzberg S. L., Kingsford C., Cattoli G., Spiro D. J., Janies D. A., Aly M. M., Brown I. H., Couacy-Hymann E., De Mia G. M., Do H. D., Guercio A., Joannis T., Ali A. S. M., Osmani A., Padalino I., Saad M. D., Savić V.,

- Sengamalay N. A., Yingst S., Zaborsky J., Zorman-Rojs O., Ghedin E., Capua I. Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses // *Emerging Infectious Diseases*. – 2007. – V. 13. – № 5. – P. 713–718.
339. Schäfer J. R., Kawaoka Y., Bean W. J., Süss J., Senne D., Webster R. G. Origin of the pandemic 1957 H2 influenza A virus and the persistence of its possible progenitors in the avian reservoir // *Virology*. – 1993. – V. 194. – № 2. – P. 781–788.
340. Schäfer W. Vergleichender sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest // *Zeitschrift für Naturforschung B*. – 1955. – V. 10. – № 2. – P. 81–91.
341. Scholtissek C., Bürger H., Kistner O., Shortridge K. F. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses // *Virology*. – 1985. – V. 147. – № 2. – P. 287–294.
342. Scotch M., Lam T. T. Y., Pabilonia K. L., Anderson T., Baroch J., Kohler D., DeLiberto T. J. Diffusion of influenza viruses among migratory birds with a focus on the Southwest United States // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2014. – V. 26. – P. 185–193.
343. Seekings A. H., Slomka M. J., Russell C., Howard W. A., Choudhury B., Nuñez A., Löndt B. Z., Cox W., Ceeraz V., Thorén P., Irvine R. M., Manvell R. J., Banks J., Brown I. H. Direct evidence of H7N7 avian influenza virus mutation from low to high virulence on a single poultry premises during an outbreak in free range chickens in the UK, 2008 // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2018. – V. 64. – P. 13–31.
344. Senne D. A. Avian influenza // *Proceedings of the United States Animal Health Association*. – 2004. – V. 108. – P. 545–547.
345. Shaman J., Kohn M. Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – V. 106. – № 9. – P. 3243–3248.

346. Shapiro G. I., Gurney Jr T., Krug R. M. Influenza virus gene expression: Control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs // *Journal of Virology*. – 1987. – V. 61. – № 3. – P. 764–773.
347. Shapiro G. I., Krug R. M. Influenza virus RNA replication in vitro: Synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer // *Journal of Virology*. – 1988. – V. 62. – № 7. – P. 2285–2290.
348. Sharshov K., Romanovskaya A., Uzhachenko R., Durymanov A., Zaykovskaya A., Kurskaya O., Ilinykh P., Silko N., Kulak M., Alekseev A., Zolotykh S., Shestopalov A., Drozdov I. Genetic and biological characterization of avian influenza H5N1 viruses isolated from wild birds and poultry in Western Siberia // *Archives of Virology*. – 2010. – V. 155. – № 7. – P. 1145–1150.
349. Shaw M. L., Palese P. Orthomyxoviridae / *Fields Virology*. – 6th edition. – Baltimore: Wolters Kluwer, 2013. – P. 1151–1185.
350. Shehata A. A., Parvin R., Sultan H., Halami M. Y., Talaat S., Abd Elrazek A., Ibrahim M., Heenemann K., Vahlenkamp T. Isolation and full genome characterization of avian influenza subtype H9N2 from poultry respiratory disease outbreak in Egypt // *Virus Genes*. – 2015. – V. 50. – № 3. – P. 389–400.
351. Sheng Z., Ran Z., Wang D., Hoppe A. D., Simonson R., Chakravarty S., Hause B. M., Li F. Genomic and evolutionary characterization of a novel influenza-C-like virus from swine // *Archives of Virology*. – 2014. – V. 159. – № 2. – P. 249–255.
352. Shi H., Ashraf S., Gao S., Lu J., Liu X. Evaluation of transmission route and replication efficiency of H9N2 avian influenza virus // *Avian Diseases*. – 2010. – V. 54. – № 1. – P. 22–27.
353. Shi J., Deng G., Kong H., Gu C., Ma S., Yin X., Zeng X., Cui P., Chen Y., Yang H., Wan X., Wang X., Liu L., Chen P., Jiang Y., Liu J., Guan Y., Suzuki Y., Li M., Qu Z., Guan L., Zang J., Gu W., Han S., Song Y., Hu Y.,

- Wang Z., Gu L., Yang W., Liang L., Bao H., Tian G., Li Y., Qiao C., Jiang L., Li C., Bu Z., Chen H. H7N9 virulent mutants detected in chickens in China pose an increased threat to humans // *Cell Research*. – 2017. – V. 27. – № 12. – P. 1409–1421.
354. Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kasai N., Kawaoka Y. Influenza virus receptors in the human airway // *Nature*. – 2006. – V. 440. – № 7083. – P. 435–436.
355. Shinya K., Hamm S., Hatta M., Ito H., Ito T., Kawaoka Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice // *Virology*. – 2004. – V. 320. – № 2. – P. 258–266.
356. Shope R. E. Swine influenza: III. filtration experiments and etiology // *Journal of Experimental Medicine*. – 1931. – V. 54. – № 3. – P. 373–385.
357. Shortridge K. F. Poultry and the influenza H5N1 outbreak in Hong Kong, 1997: Abridged chronology and virus isolation // *Vaccine*. – 1999. – V. 17. – Suppl. 1. – P. S26–S29.
358. Shortridge K. F., Zhou N. N., Guan Y., Gao P., Ito T., Kawaoka Y., Kodihalli S., Krauss S., Markwell D., Murti K. G., Norwood M., Senne D., Sims L., Takada A., Webster R. G. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong // *Virology*. – 1998. – V. 252. – № 2. – P. 331–342.
359. Sims L. D., Brown I. H. Multi-continental panzootic of H5 highly pathogenic avian influenza (1996–2015) / *Animal Influenza*. – Athens: Wiley-Blackwell, 2016. – P. 202–247.
360. Sims L., Harder T., Brown I., Gaidet N., Belot G., von Dobschuetz S., Kamata A., Kivaria F., Palamara E., Bruni M., Dauphin G., Raizman E., Lubroth J. Highly pathogenic H5 avian influenza in 2016 and 2017 – observations and future perspectives // *Focus On*. – 2017. – № 11. – P. 1–16.
361. Sivay M. V., Sayfutdinova S. G., Sharshov K. A., Alekseev A. Y., Yurlov A. K., Runstadler J., Shestopalov A. M. Surveillance of influenza A

- virus in wild birds in the Asian portion of Russia in 2008 // *Avian Diseases*. – 2012. – V. 56. – № 3. – P. 456–463.
362. Slepuskin A. N., Pysina T. V., Gonsovsky F. K., Sazonov A. A., Isacenko V. A., Sokolova N. N., Polivanov V. M., Lvov D. K., Zakstel'skaja L. J. Haemagglutination-inhibiting activity to type A influenza viruses in the sera of wild birds from the far east of the USSR // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1972. – V. 47. – № 4. – P. 527–530.
363. Slusher M. J., Wilcox B. R., Luttrell M. P., Poulson R. L., Brown J. D., Yabsley M. J., Stallknecht D. E. Are passerine birds reservoirs for influenza A viruses? // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2014. – V. 50. – № 4. – P. 792–809.
364. Smith D. J. Applications of bioinformatics and computational biology to influenza surveillance and vaccine strain selection // *Vaccine*. – 2003. – V. 21. – № 16. – P. 1758–1761.
365. Smith D. J., Lapedes A. S., De Jong J. C., Bestebroer T. M., Rimmelzwaan G. F., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus // *Science*. – 2004. – V. 305. – № 5682. – P. 371–376.
366. Smith G. J. D., Donis R. O. Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): Updated nomenclature // *Influenza and other Respiratory Viruses*. – 2012. – V. 6. – № 1. – P. 1–5.
367. Smith G. J. D., Donis R. O. Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses // *Influenza and other Respiratory Viruses*. – 2014. – V. 8. – № 3. – P. 384–388.
368. Smith G. J. D., Donis R. O., World Health Organization/World Organisation for Animal Health, Agriculture Organization H. E. W. G. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013–2014 // *Influenza and other Respiratory Viruses*. – 2015. – V. 9. – № 5. – P. 271–276.

369. Smith G. J. D., Vijaykrishna D., Bahl J., Lycett S. J., Worobey M., Pybus O. G., Ma S. K., Cheung C. L., Raghwani J., Bhatt S., Peiris J. S. M., Guan Y., Rambaut A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic // *Nature*. – 2009. – V. 459. – № 7250. – P. 1122–1125.
370. Smith G. L., Hay A. J. Replication of the influenza virus genome // *Virology*. – 1982. – V. 118. – № 1. – P. 96–108.
371. Smithies L. K., Radloff D. B., Friedell R. W., Albright G. W., Misner V. E., Easterday B. C. Two different type A influenza virus infections in turkeys in Wisconsin. I. 1965–66 outbreak // *Avian Diseases*. – 1969. – V. 13. – № 3. – P. 603–606.
372. Song Y., Cui J., Song H., Ye J., Zhao Z., Wu S., Xu C., Jiao P., Liao M. New reassortant H5N8 highly pathogenic avian influenza virus from waterfowl in Southern China // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – V. 6.
373. Spackman E., Stallknecht D. E., Slemons R. D., Winker K., Suarez D. L., Scott M., Swayne D. E. Phylogenetic analyses of type A influenza genes in natural reservoir species in North America reveals genetic variation // *Virus Research*. – 2005. – V. 114. – № 1–2. – P. 89–100.
374. Sreenivasan C. C., Thomas M., Kaushik R. S., Wang D., Li F. Influenza A in bovine species: A narrative literature review // *Viruses*. – 2019. – V. 11. – № 6.
375. Sreta D., Kedkovid R., Tuamsang S., Kitikoon P., Thanawongnuwech R. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: An experimental trial // *Virology Journal*. – 2009. – V. 6.
376. Stallknecht D. E. Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations: waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc. // *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza (28–31 May 1997, Athens, United States)*. – Athens: US Animal Health Association, 1998. – P. 61–69.

377. Stallknecht D. E., Brown J. D. Ecology of avian influenza in wild birds / Avian Influenza. – Ch. 3. – Ames: Blackwell Publishing, 2009. – P. 43–58.
378. Stallknecht D. E., Luttrell M. P., Poulson R., Goekjian V., Niles L., Dey A., Krauss S., Webster R. G. Detection of avian influenza viruses from shorebirds: Evaluation of surveillance and testing approaches // Journal of Wildlife Diseases. – 2012. – V. 48. – № 2. – P. 382–393.
379. Stallknecht D. E., Shane S. M. Host range of avian influenza virus in free-living birds // Veterinary Research Communications. – 1988. – V. 12. – № 2–3. – P. 125–141.
380. Stallknecht D. E., Shane S. M., Zwank P. J., Senne D. A., Kearney M. T. Avian influenza viruses from migratory and resident ducks of coastal Louisiana // Avian Diseases. – 1990. – V. 34. – № 2. – P. 398–405.
381. Stegeman A., Bouma A., Elbers A. R. W., De Jong M. C. M., Nodelijk G., De Klerk F., Koch G., Van Boven M. Avian influenza A virus (H7N7) epidemic in the Netherlands in 2003: Course of the epidemic and effectiveness of control measures // Journal of Infectious Diseases. – 2004. – V. 190. – № 12. – P. 2088–2095.
382. Stevens J., Chen L. M., Carney P. J., Garten R., Foust A., Le J., Pokorny B. A., Manojkumar R., Silverman J., Devis R., Rhea K., Xu X., Bucher D. J., Paulson J., Cox N. J., Klimov A., Donis R. O. Receptor specificity of influenza A H3N2 viruses isolated in mammalian cells and embryonated chicken eggs // Journal of Virology. – 2010. – V. 84. – № 16. – P. 8287–8299.
383. Stubbs E. L. Fowl pest // Journal of the American Veterinary Medical Association. – 1926. – V. 21. – P. 561–569.
384. Stubbs E. L. Fowl plague / Diseases of poultry. – 3rd edition. – Ames: Iowa State College Press, 1952. – P. 669–683.
385. Subtyping of Avian Influenza Viruses H1 to H15 on the Basis of Hemagglutinin Genes by PCR Assay and Molecular Determination of Pathogenic Potential / K. Tsukamoto [et al.] // J. of Clin. Microb. – 2008. – № 46(9). – P. 3048–3055.

386. Su S., Gu M., Liu D., Cui J., Gao G. F., Zhou J., Liu X. Epidemiology, evolution, and pathogenesis of H7N9 influenza viruses in five epidemic waves since 2013 in China // *Trends in Microbiology*. – 2017. – V. 25. – № 9. – P. 713–728.
387. Suarez D. L. Evolution of avian influenza viruses // *Veterinary Microbiology*. – 2000. – V. 74. – № 1–2. – P. 15–27.
388. Suarez D. L., Perdue M. L. Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses // *Virus Research*. – 1998. – V. 54. – № 1. – P. 59–69.
389. Suarez D. L., Perdue M. L., Cox N., Rowe T., Bender C., Huang J., Swayne D. E. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong // *Journal of Virology*. – 1998. – V. 72. – № 8. – P. 6678–6688.
390. Suarez D. L., Schultz-Cherry S. Immunology of avian influenza virus: A review // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2000. – V. 24. – № 2–3. – P. 269–283.
391. Suarez D. L., Senne D. A., Banks J., Brown I. H., Essen S. C., Lee C. W., Manvell R. J., Mathieu-Benson C., Moreno V., Pedersen J. C., Panigrahy B., Rojas H., Spackman E., Alexander D. J. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile // *Emerging Infectious Diseases*. – 2004. – V. 10. – № 4. – P. 693–699.
392. Subbarao K., Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H., Perdue M., Swayne D., Bender C., Huang J., Hemphill M., Rowe T., Shaw M., Xu X., Fukuda K., Cox N. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness // *Science*. – 1998. – V. 279. – № 5349. – P. 393–396.
393. Suzuki Y. Sialobiology of influenza molecular mechanism of host range variation of influenza viruses // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2005. – V. 28. – № 3. – P. 399–408.

394. Swayne D. E., Akey B. Avian influenza control strategies in the United States of America / Avian Influenza: Prevention and Control. – Dordrecht: Springer, 2005. – P. 113–130.
395. Swayne D. E., Beck J. R., Garcia M., Perdue M. L., Brugh M. Pathogenicity shifts in experimental avian influenza virus infections in chickens // Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza (28–31 May 1997, Athens, United States). – Athens: US Animal Health Association, 1998. – P. 171–181.
396. Swayne D. E., Pavade G., Hamilton K., Vailat B., Miyagishima K. Assessment of national strategies for control of high-pathogenicity avian influenza and low-pathogenicity notifiable avian influenza in poultry, with emphasis on vaccines and vaccination // OIE Revue Scientifique et Technique. – 2011. – V. 30. – № 3. – P. 839–870.
397. Swayne D. E., Perdue M. L., Beck J. R., Garcia M., Suarez D. L. Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years // Veterinary Microbiology. – 2000. – V. 74. – № 1–2. – P. 165–172.
398. Swayne D. E., Suarez D. L., Sims L. D. Influenza / Diseases of Poultry. – Ames: Wiley-Blackwell, 2013. – P. 181–218.
399. Synergistic effect of S224P and N383D substitutions in the PA of H5N1 avian influenza virus contributes to mammalian adaptation. / J. Song, J. Xu, J. Shi [и др.]. — Текст : непосредственный // Sci Rep. — 2015. — № 5. — С. 10510.
400. Takekawa J. Y., Prosser D. J., Collins B. M., Douglas D. C., Perry W. M., Yan B., Ze L., Hou Y., Lei F., Li T., Li Y., Newman S. H. Movements of wild ruddy shelducks in the Central Asian flyway and their spatial relationship to outbreaks of highly pathogenic avian influenza H5N1 // Viruses. – 2013. – V. 5. – № 9. – P. 2129–2152.
401. Takemae N., Tsunekuni R., Sharshov K., Tanikawa T., Uchida Y., Ito H., Soda K., Usui T., Sobolev I., Shestopalov A., Yamaguchi T., Mine J., Ito

- T., Saito T. Five distinct reassortants of H5N6 highly pathogenic avian influenza A viruses affected Japan during the winter of 2016–2017 // *Virology*. – 2017. – V. 512. – P. 8–20.
402. Tamura S. I., Kurata T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. – 2004. – V. 57. – № 6. – P. 236–247.
403. Taubenberger J. K., Morens D. M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics // *Emerging Infectious Diseases*. – 2006. – V. 12. – № 1. – P. 15–22.
404. Taubenberger J. K., Morens D. M. H5Nx panzootic bird flu-influenza's newest worldwide evolutionary tour // *Emerging Infectious Diseases*. – 2017. – V. 23. – № 2. – P. 340–342.
405. Thanh H. D., Tran V. T., Nguyen D. T., Hung V. K., Kim W. Novel reassortant H5N6 highly pathogenic influenza A viruses in Vietnamese quail outbreaks // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. – 2018. – V. 56. – P. 45–57.
406. The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. / H. Imai, K. Shinya, R. Takano [и др.]. — Текст : непосредственный // *PLoS Pathog.* — 2010. — № 6. — С. e1001106.
407. The structural variability of the influenza A hemagglutinin receptor-binding site / M. Lazniewski, WK Dawson, T. Szczepinska, D. Plewczynski. — Текст : непосредственный // *Brief Funct Genom.* — 2018. — № 17. — С. 415–427.
408. The World Organisation for Animal Health (OIE). Terrestrial Animal Health Code (2018). – 2018. – Текст : электронный. – [http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre\\_avian\\_influenza\\_viruses.htm](http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_avian_influenza_viruses.htm) (дата обращения: 05.09.2020).

409. Thompson C. I., Barclay W. S., Zambon M. C., Pickles R. J. Infection of human airway epithelium by human and avian strains of influenza A virus // *Journal of Virology*. – 2006. – V. 80. – № 16. – P. 8060–8068.
410. Tian H., Zhou S., Dong L., Van Boeckel T. P., Cui Y., Wu Y., Cazelles B., Huang S., Yang R., Grenfell B. T., Xu B. Avian influenza H5N1 viral and bird migration networks in Asia // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – V. 112. – № 1. – P. 172–177.
411. Todd C., Rice J. P. Fowl plague. A system of bacteriology // *Virus Diseases*. – 1930. – V. 7. – P. 219–230.
412. Tong S., Li Y., Rivailler P., Conrardy C., Alvarez Castillo D. A., Chen L. M., Recuenco S., Ellison J. A., Davis C. T., York I. A., Turmelle A. S., Moran D., Rogers S., Shi M., Tao Y., Weil M. R., Tang K., Rowe L. A., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K. A., Cox N. J., Anderson L. J., Rupprecht C. E., Donis R. O. A distinct lineage of influenza A virus from bats // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – V. 109. – № 11. – P. 4269–4274.
413. Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L. M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., McBride R., Carney P. J., Gilbert A. T., Chang J., Guo Z., Davis C. T., Paulson J. C., Stevens J., Rupprecht C. E., Holmes E. C., Wilson I. A., Donis R. O. New world bats harbor diverse influenza A viruses // *PLoS Pathogens*. – 2013. – V. 9. – № 10.
414. Trovão N. S., Suchard M. A., Baele G., Gilbert M., Lemey P. Bayesian inference reveals host-specific contributions to the epidemic expansion of influenza A H5N1 // *Molecular Biology and Evolution*. – 2015. – V. 32. – № 12. – P. 3264–3275.
415. Tsimokh P. F. Haemagglutination reaction in infectious sinusitis of ducks // *Veterinaria*. – 1961. – V. 38. – P. 63–65.

416. Tumpey T. M., Alvarez R., Swayne D. E., Suarez D. L. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2005. – V. 43. – № 2. – P. 676–683.
417. Turner P. E. Searching for the advantages of virus sex // *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. – 2003. – V. 33. – № 1. – P. 95–108.
418. Tweed S. A., Skowronski D. M., David S. T., Larder A., Petric M., Lees W., Li Y., Katz J., Kraiden M., Tellier R., Halpert C., Hirst M., Astell C., Lawrence D., Mak A. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia // *Emerging Infectious Diseases*. – 2004. – V. 10. – № 12. – P. 2196–2199.
419. Ungchusak K., Auewarakul P., Dowell S. F., Kitphati R., Auwanit W., Puthavathana P., Uprasertkul M., Boonnak K., Pittayawonganon C., Cox N. J., Zaki S. R., Thawatsupha P., Chittaganpitch M., Khontong R., Simmerman J. M., Chunsuttiwat S. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1) // *New England Journal of Medicine*. – 2005. – V. 352. – № 4. – P. 333–340.
420. United States Animal Health Association. Report of the Committee on Transmissible Diseases of Poultry and Other Avian Species. Criteria for determining that an AI virus isolation causing an outbreak must be considered for eradication / *Proceedings of the 98th Annual Meeting of the U.S.* – Richmond: U.S. Animal Health Association, 1994. – P. 522.
421. van Boeckel T. P., Thanapongtharm W., Robinson T., Biradar C. M., Xiao X., Gilbert M. Improving risk models for avian influenza: the role of intensive poultry farming and flooded land during the 2004 Thailand epidemic // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – № 11.
422. Van Dijk J. G. B., Hoyer B. J., Verhagen J. H., Nolet B. A., Fouchier R. A. M., Klaassen M. Juveniles and migrants as drivers for seasonal epizootics of avian influenza virus // *Journal of Animal Ecology*. – 2014. – V. 83. – № 1. – P. 266–275.

423. Van Kerkhove M. D., Hirve S., Koukounari A., Mounts A. W., Allwinn R., Bandaranayake, Bella, Bone A., Carrat F., Chadha M. S., Chen M., Chi C. Y., Cox, Cretikos M., Crowcroft N., Cutter J., Donnelly C. A., de Lamballerie X., Dellagi, Doukas G., Dudareva-Vizule S., Ferguson N. M., Fry A. M., Gilbert G. L., Haas W., Hardelid P., Horby P., Huang Q. S., Hungnes O., Ikonen N., Iwatsuki-Horimoto K., Julkunen I., Katz J., Kawaoka Y., Lalvani A., Levy-Bruhl D., Maltezou H. C., McVernon J., Miller M., Mishra A. C., Moghadami M., Pawar S. D., Reed C., Riley S., Rizzo C., Rosella L., Ross T. M., Shu Y., Skowronski D. M., Sridhar S., Steens A., Tandale B. V., Theodoridou M., van Boven M., Waalen K., Wang J. R., Wu J. T., Xu C., Zimmer S. Estimating age-specific cumulative incidence for the 2009 influenza pandemic: A meta-analysis of A(H1N1)pdm09 serological studies from 19 countries // *Influenza and other Respiratory Viruses*. – 2013. – V. 7. – № 5. – P. 872–886.
424. Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: Our current understanding of the zoonotic risk // *Veterinary Research*. – 2007. – V. 38. – № 2. – P. 243–260.
425. Van Reeth K., Gregory V., Hay A., Pensaert M. Protection against a European H1N2 swine influenza virus in pigs previously infected with H1N1 and/or H3N2 subtypes // *Vaccine*. – 2003. – V. 21. – № 13–14. – P. 1375–1381.
426. Van Reeth K., Labarque G., Clercq S. D., Pensaert M. Efficacy of vaccination of pigs with different H1N1 swine influenza viruses using a recent challenge strain and different parameters of protection // *Vaccine*. – 2001. – V. 19. – № 31. – P. 4479–4486.
427. Van Reeth K., Labarque G., Pensaert M. Serological profiles after consecutive experimental infections of pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 swine influenza viruses // *Viral Immunology*. – 2006. – V. 19. – № 3. – P. 373–382.

428. Van Reeth K., Nauwynck H., Pensaert M. Clinical effects of experimental dual infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by swine influenza virus in conventional and colostrum-deprived pigs // *Journal of Veterinary Medicine, Series B.* – 2001. – V. 48. – № 4. – P. 283–292.
429. Van Reeth K., Nauwynck H., Pensaert M. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: A clinical and virological study // *Veterinary Microbiology.* – 1996. – V. 48. – № 3–4. – P. 325–335.
430. Vasin A. V., Temkina O. A., Egorov V. V., Klotchenko S. A., Plotnikova M. A., Kiselev O. I. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins // *Virus Research.* – 2014. – V. 185. – P. 53–63.
431. Verhagen J. H., Herfst S., Fouchier R. A. M. How a virus travels the world // *Science.* – 2015. – V. 347. – № 6222. – P. 616–617.
432. Verhagen J. H., Majoor F., Lexmond P., Vuong O., Kasemir G., Lutterop D., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M., Kuiken T. Epidemiology of influenza A virus among blackheaded gulls, the Netherlands, 2006–2010 // *Emerging Infectious Diseases.* – 2014. – V. 20. – № 1. – P. 138–141.
433. Verhagen J. H., van der Jeugd H. P., Nolet B. A., Slaterus R., Kharitonov S. P., de Vries P. P., Vuong O., Majoor F., Kuiken T., Fouchier R. A. Wild bird surveillance around outbreaks of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus in the Netherlands, 2014, within the context of global flyways // *Eurosurveillance.* – 2015. – V. 20. – № 12. – P. 21–32.
434. Verhagen J. H., Van Dijk J. G. B., Vuong O., Bestebroer T., Lexmond P., Klaassen M., Fouchier R. A. M. Migratory birds reinforce local circulation of avian influenza viruses // *PLoS ONE.* – 2014. – V. 9. – № 11.
435. Vines A., Wells K., Matrosovich M., Castrucci M. R., Ito T., Kawaoka Y. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in

- receptor specificity and host range restriction // *Journal of Virology*. – 1998. – V. 72. – № 9. – P. 7626–7631.
436. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene / J-X Long, D-X Peng, Y-L Liu [и др.]. — Текст : непосредственный // *Virus Genes*. — 2008. — № 36. — С. 471–478.
437. Virus Taxonomy: 2020 Release. — Текст : электронный // International Committee on Taxonomy of Viruses : [сайт]. — URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (дата обращения: 27.07.2021).
438. Vladimirtseva M. V., Germogenov N. I. Birds of Yakutia: Fauna diversity, ecology, role in ecosystems and human life // *Journal of Biodiversity & Endangered Species*. – 2013. – V. 1. – № 3. – P. 1–3.
439. Walker R. V. L., Bannister G. L. A filterable agent in ducks // *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*. – 1953. – V. 17. – P. 248–250.
440. Wan H., Perez D. R. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses // *Virology*. – 2006. – V. 346. – № 2. – P. 278–286.
441. Wang H., Feng Z., Shu Y., Yu H., Zhou L., Zu R., Huai Y., Dong J., Bao C., Wen L., Wang H., Yang P., Zhao W., Dong L., Zhou M., Liao Q., Yang H., Wang M., Lu X., Shi Z., Wang W., Gu L., Zhu F., Li Q., Yin W., Yang W., Li D., Uyeki T. M., Wang Y. Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China // *The Lancet*. – 2008. – V. 371. – № 9622. – P. 1427–1434.
442. Ward A. C., Castelli L. A., Lucantoni A. C., White J. F., Azad A. A., Macreadie I. G. Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus // *Archives of Virology*. – 1995. – V. 140. – № 11. – P. 2067–2073.
443. Webby R. J., Webster R. G. Are we ready for pandemic influenza? // *Science*. – 2003. – V. 302. – № 5650. – P. 1519–1522.

444. Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses // *Microbiological Reviews*. – 1992. – V. 56. – № 1. – P. 152–179.
445. Webster R. G., Laver W. G. Determination of the number of nonoverlapping antigenic areas on Hong Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance // *Virology*. – 1980. – V. 104. – № 1. – P. 139–148.
446. Webster R. G., Shortridge K. F., Kawaoka Y. Influenza: Interspecies transmission and emergence of new pandemics // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 1997. – V. 18. – № 4. – P. 275–279.
447. Weingartl H. M., Albrecht R. A., Lager K. M., Babiuk S., Marszal P., Neufeld J., Embury-Hyatt C., Lekcharoensuk P., Tumpey T. M., García-Sastre A., Richt J. A. Experimental infection of pigs with the human 1918 pandemic influenza virus // *Journal of Virology*. – 2009. – V. 83. – № 9. – P. 4287–4296.
448. Weis W., Brown J. H., Cusack S., Paulson J. C., Skehel J. J., Wiley D. C. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid // *Nature*. – 1988. – V. 333. – № 6172. – P. 426–431.
449. Wilcox B. R., Knutsen G. A., Berdeen J., Goekjian V., Poulson R., Goyal S., Sreevatsan S., Cardona C., Berghaus R. D., Swayne D. E., Yabsley M. J., Stallknecht D. E. Influenza-A viruses in ducks in northwestern Minnesota: Fine scale spatial and temporal variation in prevalence and subtype diversity // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6. – № 9.
450. Wiley D. C., Wilson I. A., Skehel J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation // *Nature*. – 1981. – V. 289. – № 5796. – P. 373–378.
451. Wilkinson L., Waterson A. P. The development of the virus concept as reflected in corpora of studies on individual pathogens: 2. The agent of fowl

- plague – a model virus? // *Medical History*. – 1975. – V. 19. – № 1. – P. 52–72.
452. Wilson I. A., Skehel J. J., Wiley D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution // *Nature*. – 1981. – V. 289. – № 5796. – P. 366–373.
453. Winkler W. G., Trainer D. O., Easterday B. C. Influenza in Canada geese // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1972. – V. 47. – № 4. – P. 507–513.
454. World Health Organisation. Avian influenza: assessing the pandemic threat. – Geneva: WHO, 2005. – 64 p. – Текст : электронный. – URL: [https://www.who.int/influenza/resources/documents/h5n1\\_assessing\\_pandemic\\_threat/en](https://www.who.int/influenza/resources/documents/h5n1_assessing_pandemic_threat/en) (дата обращения: 05.09.2020).
455. World Health Organisation. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003–2018. – Geneva: WHO, 2018. – Текст : электронный. – URL: [https://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/2018\\_07\\_20\\_tableH5N1.pdf?ua=1](https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2018_07_20_tableH5N1.pdf?ua=1) (дата обращения: 05.09.2020).
456. World Health Organisation. H5N1 avian influenza: timeline of major events. – Geneva: WHO, 2014. – Текст : электронный. – URL: [https://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/H5N1\\_cumulative\\_table\\_archives/en](https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en) (дата обращения: 05.09.2020).
457. World Health Organization. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. – Geneva: WHO, 2002. – 105 p. – Текст : электронный. – URL: <http://www.who.int/iris/handle/10665/68026> (дата обращения: 05.09.2020).
458. Wright P. F., Neumann G., Kawaoka Y. Orthomyxoviruses / *Fields Virology*. – 5th edition. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. – P. 1691–1740.
459. Wu H., Peng X., Xu L., Jin C., Cheng L., Lu X., Xie T., Yao H., Wu N. Characterization of a novel highly pathogenic H5N2 avian influenza virus

- isolated from a duck in eastern China // *Archives of Virology*. – 2014. – V. 159. – № 12. – P. 3377–3383.
460. Wu H., Peng X., Xu L., Jin C., Cheng L., Lu X., Xie T., Yao H., Wu N. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses in domestic ducks, Eastern China // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – V. 20. – № 8. – P. 1315–1318.
461. Wu P., Jiang H., Wu J. T., Chen E., He J., Zhou H., Wei L., Yang J., Yang B., Qin Y., Fang V. J., Li M., Tsang T. K., Zheng J., Lau E. H. Y., Cao Y., Chai C., Zhong H., Li Z., Leung G. M., Feng L., Gao G. F., Cowling B. J., Yu H. Poultry market closures and human infection with influenza A(H7N9) virus, China, 2013–14 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – V. 20. – № 11. – P. 1891–1894.
462. Xu K. M., Li K. S., Smith G. J. D., Li J. W., Tai H., Zhang J. X., Webster R. G., Peiris J. S. M., Chen H., Guan Y. Evolution and molecular epidemiology of H9N2 influenza A viruses from quail in Southern China, 2000 to 2005 // *Journal of Virology*. – 2007. – V. 81. – № 6. – P. 2635–2645.
463. Xu W., Dai Y., Hua C., Wang Q., Zou P., Deng Q., Jiang S., Lu L. Genomic signature analysis of the recently emerged highly pathogenic A(H5N8) avian influenza virus: implying an evolutionary trend for bird-to-human transmission // *Microbes and Infection*. – 2017. – V. 19. – № 12. – P. 597–604.
464. Yamada S., Suzuki Y., Suzuki T., Le M. Q., Nidom C. A., Sakai-Tagawa Y., Muramoto Y., Ito M., Kiso M., Horimoto T., Shinya K., Sawada T., Kiso M., Usui T., Murata T., Lin Y., Hay A., Haire L. F., Stevens D. J., Russell R. J., Gamblin S. J., Skehel J. J., Kawaoka Y. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors // *Nature*. – 2006. – V. 444. – № 7117. – P. 378–382.
465. Yang H., Carney P. J., Mishin V. P., Guo Z., Chang J. C., Wentworth D. E., Gubareva L. V., Stevens J. Molecular characterizations of surface

- proteins hemagglutinin and neuraminidase from recent H5Nx avian influenza viruses // *Journal of Virology*. – 2016. – V. 90. – № 12. – P. 5770–5784.
466. Yang L., Zhu W., Li X., Bo H., Zhang Y., Zou S., Gao R., Dong J., Zhao X., Chen W., Dong L., Zou X., Xing Y., Wang D., Shu Y. Genesis and dissemination of highly pathogenic H5N6 avian influenza viruses // *Journal of Virology*. – 2017. – V. 91. – № 5.
467. Yang L., Zhu W., Li X., Chen M., Wu J., Yu P., Qi S., Huang Y., Shi W., Dong J., Zhao X., Huang W., Li Z., Zeng X., Bo H., Chen T., Chen W., Liu J., Zhang Y., Liang Z., Shi W., Shu Y., Wang D. Genesis and spread of newly emerged highly pathogenic H7N9 avian viruses in mainland China // *Journal of Virology*. – 2017. – V. 91. – № 23.
468. Yazawa S., Okada M., Ono M., Fujii S., Okuda Y., Shibata I., Kida H. Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus (A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae* // *Veterinary Microbiology*. – 2004. – V. 98. – № 3–4. – P. 221–228.
469. Yingst S. L., Saad M. D., Felt S. A. Qinghai-like H5N1 from domestic cats, northern Iraq // *Emerging Infectious Diseases*. – 2006. – V. 12. – № 8. – P. 1295–1297.
470. Youzbashi E., Marschall M., Chaloupka I., Meier-Ewert H. Distribution of influenza C virus infection in dogs and pigs in Bavaria // *Tierärztliche Praxis*. – 1996. – V. 24. – P. 337–342.
471. Yu H., Wu J. T., Cowling B. J., Liao Q., Fang V. J., Zhou S., Wu P., Zhou H., Lau E. H. Y., Guo D., Ni M. Y., Peng Z., Feng L., Jiang H., Luo H., Li Q., Feng Z., Wang Y., Yang W., Leung G. M. Effect of closure of live poultry markets on poultry-to-person transmission of avian influenza A H7N9 virus: An ecological study // *The Lancet*. – 2014. – V. 383. – № 9916. – P. 541–548.
472. Yuen K. Y., Chan P. K. S., Peiris M., Tsang D. N. C., Que T. L., Shortridge K., Cheung P. T., To W. K., Ho E. T. F., Sung R., Cheng A. F. B. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with

- avian influenza A H5N1 virus // *The Lancet*. – 1998. – V. 351. – № 9101. – P. 467–471.
473. Zakstel'skaja L. J., Isacenko V. A., Osidze N. G., Timofeeva C. C., Slepuskin A. N., Sokolova N. N. Some observations on the circulation of influenzaviruses in domestic and wild birds // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1972. – V. 47. – № 4. – P. 497–501.
474. Zakstelskaya L. Y., Yakhno M. A., Isachenko V. A., Klimenko S. M., Molibog E. V., Andreev V. P., Lvov D. K., Yamnikova S. S. Isolation and peculiarities of influenza virus (tern) (Turkmenistan 18) 73 // *Virologiia Virusov*. – 1974. – V. 2. – P. 93–98.
475. Zhang R., Chen T., Ou X., Liu R., Yang Y., Ye W., Chen J., Yao D., Sun B., Zhang X., Zhou J., Sun Y., Chen F., Wang S. P. Clinical, epidemiological and virological characteristics of the first detected human case of avian influenza A(H5N6) virus // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2016. – V. 40. – P. 236–242.
476. Zhao G., Gu X., Lu X., Pan J., Duan Z., Zhao K., Gu M., Liu Q., He L., Chen J., Ge S., Wang Y., Chen S., Wang X., Peng D., Wan H., Liu X. Novel Reassortant Highly Pathogenic H5N2 Avian Influenza Viruses in Poultry in China // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – № 9.
477. Zhao K., Gu M., Zhong L., Duan Z., Zhang Y., Zhu Y., Zhao G., Zhao M., Chen Z., Hu S., Liu W., Liu X., Peng D., Liu X. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – V. 163. – № 3–4. – P. 351–357.
478. Zhou L. C., Liu J., Pei E. L., Xue W. J., Lyu J. M., Cai Y. T., Wu D., Wu W., Liu Y. Y., Jin H. Y., Gao Y. W., Wang Z. H., Wang T. H. Novel avian influenza A(H5N8) viruses in migratory birds, China, 2013–2014 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2016. – V. 22. – № 6. – P. 1121–1123.
479. Zhou L., Tan Y., Kang M., Liu F., Ren R., Wang Y., Chen T., Yang Y., Li C., Wu J., Zhang H., Li D., Greene C. M., Zhou S., Iuliano A. D., Havers F., Ni D., Wang D., Feng Z., Uyeki T. M., Li Q. Preliminary epidemiology of

- human infections with highly pathogenic avian influenza A(H7N9) virus, China, 2017 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2017. – V. 23. – № 8. – P. 1355–1359.
480. Zhou N. N., Senne D. A., Landgraf J. S., Swenson S. L., Erickson G., Rossow K., Liu L., Yoon K. J., Krauss S., Webster R. G. Emergence of H3N2 reassortant influenza A viruses in North American pigs // *Veterinary Microbiology*. – 2000. – V. 74. – № 1–2. – P. 47–58.
481. Zhu H., Wang D., Kelvin D. J., Li L., Zheng Z., Yoon S. W., Wong S. S., Farooqui A., Wang J., Banner D., Chen R., Zheng R., Zhou J., Zhang Y., Hong W., Dong W., Cai Q., Roehrl M. H. A., Huang S. S. H., Kelvin A. A., Yao T., Zhou B., Chen X., Leung G. M., Poon L. L. M., Webster R. G., Webby R. J., Peiris J. S. M., Guan Y., Shu Y. Infectivity, transmission, and pathology of human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs // *Science*. – 2013. – V. 341. – № 6142. – P. 183–186.
482. Zou W., Guo X., Li S., Yang Y., Jin M. Complete genome sequence of a novel natural recombinant H5N5 influenza virus from ducks in Central China // *Journal of Virology*. – 2012. – V. 86. – № 24. – P. 13878.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1 - Регистрационные номера нуклеотидных последовательностей всех сегментов генома вирусов гриппа А, выделенных в данной работе, задепонированных в международной базе данных GISAID.

№	Наименование штамма	Подтип	Регистрационный номер в базе данных GISAID
1.	A/goose/Samara/675/2018	H5N8	EPI_ISL_320684
2.	A/goose/Samara/673/2018	H5N8	EPI_ISL_320683
3.	A/goose/Samara/459/2018	H5N8	EPI_ISL_320661
4.	A/goose/Samara/455/2018	H5N8	EPI_ISL_320660
5.	A/goose/Krasnodar/3144/2017	H5N8	EPI_ISL_247722
6.	A/common gull/Saratov/1676/2018	H5N6	EPI_ISL_336925
7.	A/environment/Kamchatka/117/2016	H13N8	EPI_ISL_256303
8.	A/environment/Kamchatka/18/2016	H5N5	EPI_ISL_256301
9.	A/mute swan/Kaliningrad/132/2017	H5N8	EPI_ISL_274858
10.	A/mute swan/Krasnodar/25/2017	H5N8	EPI_ISL_247723
11.	A/turkey/Rostov-on-Don/1117/2018	H5N8	EPI_ISL_336930
12.	A/turkey/Rostov-on-Don/817/2018	H5N8	EPI_ISL_320675
13.	A/turkey/Rostov-on-Don/11/2017	H5N8	EPI_ISL_247721
14.	A/rook/Sartlan/42/2015	H5N1	EPI_ISL_193364
15.	A/rook/Dovolnoe/50/2015	H5N1	EPI_ISL_193363
16.	A/rook/Chany/32/2015	H5N1	EPI_ISL_193362
17.	A/long-eared owl/Voronezh/15/2017	H5N8	EPI_ISL_247715
18.	A/swine/Irkutsk/155/2017	H3N2	EPI_ISL_297427
19.	A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	EPI_ISL_169427
20.	A/gadwall/Kurgan/2442/2016	H5N8	EPI_ISL_256298
21.	A/long-eared owl/Voronezh/16/2017	H5N8	EPI_ISL_247717
22.	A/Ural owl/Voronezh/14/2017	H5N8	EPI_ISL_247716
23.	A/chicken/Primorsky_Krai/05/2018	H9N2	EPI_ISL_321316
24.	A/chicken/Primorsky_Krai/03/2018	H9N2	EPI_ISL_321315
25.	A/chicken/Tatarstan/88/2017	H5N8	EPI_ISL_275288
26.	A/chicken/Rostov-on-Don/44/2017	H5N8	EPI_ISL_275287
27.	A/chicken/Shchyolkovo/47/2017	H5N8	EPI_ISL_275283
28.	A/chicken/Sergiyev Posad/39/2017	H5N8	EPI_ISL_256300
29.	A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017	H5N8	EPI_ISL_256299
30.	A/chicken/Kalmykia/2643/2016	H5N8	EPI_ISL_247725
31.	A/chicken/Voronezh/20/2017	H5N8	EPI_ISL_247720
32.	A/chicken/Voronezh/19/2017	H5N8	EPI_ISL_247719
33.	A/chicken/Voronezh/18/2017	H5N8	EPI_ISL_247718

34.	A/chicken/Astrakhan/3131/2016	H5N8	EPI_ISL_240110
35.	A/chicken/Kalmykia/2661/2016	H5N8	EPI_ISL_240109
36.	A/wild duck/Tatarstan/3059/2016	H5N8	EPI_ISL_247724
37.	A/common teal/Chany/893/2018	H3N6	EPI_ISL_333614
38.	A/common teal/Chany/892/2018	H3N6	EPI_ISL_333613
39.	A/common teal/Chany/891/2018	H3N6	EPI_ISL_333612
40.	A/common teal/Chany/889/2018	H3N6	EPI_ISL_333611
41.	A/mallard/Tomsk/1391/2018	H9N2	EPI_ISL_338280
42.	A/mallard/Khabarovsk/241/2017	H10N6	EPI_ISL_333427
43.	A/mallard/Toguchin/19/2017	H4N6	EPI_ISL_332690
44.	A/mallard/Toguchin/13/2017	H4N6	EPI_ISL_332687
45.	A/mallard/Toguchin/1154/2016	H6N1	EPI_ISL_332679
46.	A/duck/Samara/452/2018	H5N8	EPI_ISL_320659
47.	A/wild duck/Omsk/01111/2020	H5N8	EPI_ISL_644138
48.	A/teal/Toguchin/1157/2016	H6N1	EPI_ISL_332682
49.	A/teal/Toguchin/1156/2016	H6N1	EPI_ISL_332681
50.	A/teal/Toguchin/1153/2016	H6N1	EPI_ISL_332677
51.	A/gadwall/Chany/893/2018	H3N8	EPI_ISL_333615
52.	A/green sandpiper/Kurgan/1050/2018	H3N8	EPI_ISL_355938
53.	A/green sandpiper/Kurgan/1048/2018	H3N8	EPI_ISL_355937
54.	A/green sandpiper/Kurgan/1046/2018	H3N8	EPI_ISL_355936
55.	A/green sandpiper/Kurgan/1043/2018	H3N8	EPI_ISL_355935
56.	A/chicken/Primorsky Krai/1771/2018	H9N2	EPI_ISL_336927
57.	A/chicken/Tatarstan/112/2017	H5N8	EPI_ISL_340075
58.	A/chicken/Mari El/870/2018	H5N8	EPI_ISL_337151
59.	A/chicken/Voronezh/1513/2018	H5N8	EPI_ISL_336933
60.	A/chicken/Voronezh/1504/2018	H5N8	EPI_ISL_336932
61.	A/chicken/Voronezh/1491/2018	H5N8	EPI_ISL_336931
62.	A/chicken/Voronezh/1488/2018	H5N8	EPI_ISL_336929
63.	A/chicken/Tatarstan/7/2018	H5N8	EPI_ISL_320958
64.	A/chicken/Cheboksary/854/2018	H5N8	EPI_ISL_320957
65.	A/chicken/Cheboksary/853/2018	H5N8	EPI_ISL_320956
66.	A/chicken/Cheboksary/851/2018	H5N8	EPI_ISL_320955
67.	A/chicken/Cheboksary/850/2018	H5N8	EPI_ISL_320954
68.	A/chicken/Cheboksary/849/2018	H5N8	EPI_ISL_320953
69.	A/chicken/Samara/679/2018	H5N8	EPI_ISL_320685
70.	A/chicken/Kursk/762/2018	H5N8	EPI_ISL_320682
71.	A/chicken/Kursk/760/2018	H5N8	EPI_ISL_320681
72.	A/chicken/Kursk/757/2018	H5N8	EPI_ISL_320680
73.	A/chicken/Cheboksary/806/2018	H5N8	EPI_ISL_320679
74.	A/chicken/Cheboksary/805/2018	H5N8	EPI_ISL_320678
75.	A/chicken/Penza/607/2018	H5N8	EPI_ISL_320677
76.	A/chicken/Penza/605/2018	H5N8	EPI_ISL_320676

77.	A/chicken/Rostov-on-Don/766/2018	H5N8	EPI_ISL_320674
78.	A/chicken/Orel/533/2018	H5N8	EPI_ISL_320664
79.	A/chicken/Penza/301/2018	H5N8	EPI_ISL_320663
80.	A/chicken/Penza/300/2018	H5N8	EPI_ISL_320662
81.	A/chicken/Samara/447/2018	H5N8	EPI_ISL_320658
82.	A/chicken/Samara/446/2018	H5N8	EPI_ISL_320657
83.	A/chicken/Kursk/526/2018	H5N8	EPI_ISL_320608
84.	A/chicken/Kursk/284/2018	H5N8	EPI_ISL_320607
85.	A/chicken/Kostroma/1721/2017	H5N2	EPI_ISL_297466
86.	A/chicken/Kostroma/1720/2017	H5N2	EPI_ISL_297465
87.	A/chicken/Kostroma/1719/2017	H5N2	EPI_ISL_297464
88.	A/chicken/Kostroma/1717/2017	H5N2	EPI_ISL_297463
89.	A/chicken/Rostov-on-Don/1598/2017	H5N8	EPI_ISL_297235
90.	A/chicken/Rostov-on-Don/1321/2017	H5N8	EPI_ISL_297234
91.	A/chicken/Kostroma/1718/2017	H5N2	EPI_ISL_295027
92.	A/swine/Irkutsk/155/2017	H3N2	EPI_ISL_321756
93.	A/swine/Irkutsk/85/2018	H3N2	EPI_ISL_321596

Роспотребнадзор

Приложение 2 – Справка о депонировании штаммов вируса гриппа А, выделенных в данной работе, в Государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора



СЕРТИФИЦИРУЮ  
 Главный директор  
 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
 Роспотребнадзора  
 Г.А. Максютов

“24” 03 2021 г.

СПИСОК

штаммов вируса гриппа А, депонированных в Государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

№ п/п	Регистрционный номер	Вид	Штамм	Дата регистрации
1	V-699	Вирус гриппа А	A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8)	05.02.2016
2	V-700	Вирус гриппа А	A/rook/Chany/606/2014(H3N8)	05.02.2016
3	V-701	Вирус гриппа А	A/mallard/Khabarovsk/12/2014(H10N7)	05.02.2016
4	V-702	Вирус гриппа А	A/gull/ Khabarovsk/7/2014(H13N6)	05.02.2016
5	V-703	Вирус гриппа А	A/mallard/Chany/31/2015 (H5N1)	05.02.2016
6	V-704	Вирус гриппа А	A/rook/Chany/32/2015 (H5N1)	05.02.2016
7	V-705	Вирус гриппа А	A/rook/Chany/33/2015 (H5N1)	05.02.2016
8	V-706	Вирус гриппа А	A/crane/Chany/34/2015 (H5N1)	05.02.2016
9	V-707	Вирус гриппа А	A/duck/Chany/35/2015 (H5N1)	05.02.2016
10	V-708	Вирус гриппа А	A/rook/Sartlan/42/2015 (H5N1)	05.02.2016
11	V-709	Вирус гриппа А	A/rook/Dovolnoe/50/2015 (H5N1)	05.02.2016
12	V-721	Вирус гриппа А	A/black-headed gull/Tyva/41/2016 (H5N8)	07.04.2017
13	V-722	Вирус гриппа А	A/environment/Kamchatka/23/2016 (H13N8)	07.04.2017
14	V-723	Вирус гриппа А	A/environment/Kamchatka/24/2016 (H13N8)	07.04.2017
15	V-724	Вирус гриппа А	A/great crested grebe/Tyva/34/2016 (H5N8)	07.04.2017
16	V-725	Вирус гриппа А	A/wild duck/Tyva/35/2016 (H5N8)	07.04.2017
17	V-726	Вирус гриппа А	A/grey heron/Tyva/20/2016 (H5N8)	07.04.2017
18	V-727	Вирус гриппа А	A/grey heron/Tyva/33/2016 (H5N8)	07.04.2017
19	V-728	Вирус гриппа А	A/chicken/Kalmykia/2655/2016 (H5N8)	07.04.2017
20	V-729	Вирус гриппа А	A/chicken/Kalmykia/2667/2016 (H5N8)	07.04.2017
21	V-730	Вирус гриппа А	A/chicken/Kalmykia/2634/2016 (H5N8)	07.04.2017

Приложение 2 – Справка о депонировании штаммов вируса гриппа А, выделенных в данной работе, в Государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

22	V-731	Вирус гриппа А	A/chicken/Kalmykia/2643/2016 (H5N8)	07.04.2017
23	V-813	Вирус гриппа А	A/chicken/Astrakhan/3131/2016 (H5N8)	16.11.2018
24	V-814	Вирус гриппа А	A/goose/Krasnodar/3144/2017 (H5N8)	16.11.2018
25	V-815	Вирус гриппа А	A/mute swan/Krasnodar/25/2017 (H5N8)	16.11.2018
26	V-816	Вирус гриппа А	A/turkey/Rostov/11/2017 (H5N8)	16.11.2018
27	V-817	Вирус гриппа А	A/northern goshawk/Voronezh/13/2017 (H5N8)	16.11.2018
28	V-818	Вирус гриппа А	A/long-eared owl/Voronezh/15/2017 (H5N8)	16.11.2018
29	V-819	Вирус гриппа А	A/long-eared owl/Voronezh/16/2017 (H5N8)	16.11.2018
30	V-820	Вирус гриппа А	A/chicken/Voronezh/18/2017 (H5N8)	16.11.2018
31	V-821	Вирус гриппа А	A/chicken/Voronezh/19/2017 (H5N8)	16.11.2018
32	V-822	Вирус гриппа А	A/chicken/Voronezh/20/2017 (H5N8)	16.11.2018
33	V-823	Вирус гриппа А	A/mute swan/Kaliningrad/132/2017 (H5N8)	16.11.2018
34	V-824	Вирус гриппа А	A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017 (H5N8)	16.11.2018
35	V-825	Вирус гриппа А	A/chicken/Sergiyev Posad/39/2017 (H5N8)	16.11.2018
36	V-826	Вирус гриппа А	A/chicken/Shchyolkovo/47/2017 (H5N8)	16.11.2018
37	V-827	Вирус гриппа А	A/garganey/Altai/2092/2016 (H5N8)	16.11.2018
38	V-828	Вирус гриппа А	A/gadwall/Kurgan/2442/2016 (H5N8)	16.11.2018
39	V-829	Вирус гриппа А	A/turkey/Perm/7887/2017 (H5N8)	16.11.2018
40	V-830	Вирус гриппа А	A/chicken/Tatarstan/88/2017 (H5N8)	16.11.2018
51	V-831	Вирус гриппа А	A/chicken/Tatarstan/112/2017 (H5N8)	16.11.2018
52	V-832	Вирус гриппа А	A/unknown/Tatarstan/86/2017 (H5N8)	16.11.2018
53	V-833	Вирус гриппа А	A/unknown/Tatarstan/94/2017 (H5N8)	16.11.2018
54	V-834	Вирус гриппа А	A/unknown/Tatarstan/97/2017 (H5N8)	16.11.2018
55	V-835	Вирус гриппа А	A/chicken/Mari El/236/2017 (H5N8)	16.11.2018
56	V-836	Вирус гриппа А	A/chicken/Rostov-on-Don/44/2017 (H5N8)	16.11.2018
57	V-837	Вирус гриппа А	A/chicken/Rostov-on-Don/1321/2017 (H5N8)	16.11.2018
58	V-838	Вирус гриппа А	A/chicken/Rostov-on-Don/1598/2017 (H5N8)	16.11.2018
59	V-913	Вирус гриппа А	A/chicken/Kursk/284/2018(H5N8)	24.06.2019
60	V-914	Вирус гриппа А	A/chicken/Kursk/526/2018(H5N8)	24.06.2019
61	V-915	Вирус гриппа А	A/chicken/Kursk/757/2018(H5N8)	24.06.2019
62	V-916	Вирус гриппа А	A/chicken/Kursk/760/2018(H5N8)	24.06.2019
63	V-917	Вирус гриппа А	A/chicken/Kursk/762/2018(H5N8)	24.06.2019
64	V-918	Вирус гриппа А	A/chicken/Samara/446/2018(H5N8)	24.06.2019

Приложение 2 – Справка о депонировании штаммов вируса гриппа А, выделенных в данной работе, в Государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

65	V-919	Вирус гриппа А	A/chicken/Samara/447/2018(H5N8)	24.06.2019
66	V-920	Вирус гриппа А	A/duck/Samara/452/2018(H5N8)	24.06.2019
67	V-921	Вирус гриппа А	A/goose/Samara/455/2018(H5N8)	24.06.2019
68	V-922	Вирус гриппа А	A/goose/Samara/459/2018(H5N8)	24.06.2019
69	V-923	Вирус гриппа А	A/goose/Samara/673/2018(H5N8)	24.06.2019
70	V-924	Вирус гриппа А	A/goose/Samara/675/2018(H5N8)	24.06.2019
71	V-925	Вирус гриппа А	A/chicken/Samara/679/2018(H5N8)	24.06.2019
72	V-926	Вирус гриппа А	A/chicken/Penza/300/2018(H5N8)	24.06.2019
73	V-927	Вирус гриппа А	A/chicken/Penza/301/2018(H5N8)	24.06.2019
74	V-928	Вирус гриппа А	A/chicken/Penza/605/2018(H5N8)	24.06.2019
75	V-929	Вирус гриппа А	A/chicken/Penza/607/2018(H5N8)	24.06.2019
76	V-930	Вирус гриппа А	A/chicken/Orel/533/2018(H5N8) (H5N8)	24.06.2019
77	V-931	Вирус гриппа А	A/chicken/Rostov-on-Don/766/2018(H5N8)	24.06.2019
78	V-932	Вирус гриппа А	A/turkey/Rostov-on-Don/817/2018(H5N8)	24.06.2019
79	V-933	Вирус гриппа А	A/chicken/Cheboksary/805/2018(H5N8)	24.06.2019
80	V-934	Вирус гриппа А	A/chicken/Cheboksary/806/2018(H5N8)	24.06.2019
81	V-935	Вирус гриппа А	A/chicken/Cheboksary/849/2018(H5N8)	24.06.2019
82	V-936	Вирус гриппа А	A/chicken/Cheboksary/850/2018(H5N8)	24.06.2019
83	V-937	Вирус гриппа А	A/chicken/Cheboksary/851/2018(H5N8)	24.06.2019
84	V-938	Вирус гриппа А	A/chicken/Cheboksary/853/2018(H5N8)	24.06.2019
85	V-939	Вирус гриппа А	A/chicken/Cheboksary/854/2018(H5N8)	24.06.2019
86	V-940	Вирус гриппа А	A/chicken/Mari El/870/2018(H5N8)	24.06.2019
87	V-941	Вирус гриппа А	A/green sandpiper/Kurgan/1043/2018(H3N8)	24.06.2019
88	V-942	Вирус гриппа А	A/green sandpiper/Kurgan/1046/2018 (H3N8)	24.06.2019
89	V-943	Вирус гриппа А	A/green sandpiper/Kurgan/1048/2018(H3N8)	24.06.2019
90	V-944	Вирус гриппа А	A/green sandpiper/Kurgan/1050/2018(H3N8)	24.06.2019
91	V-945	Вирус гриппа А	A/chicken/Primorsky Krai/1771/2018(H9N2)	24.06.2019
92	V-946	Вирус гриппа А	A/swine/Irkutsk/155/2017(H3N2)	24.06.2019
93	V-947	Вирус гриппа А	A/swine/Irkutsk/85/2018(H3N2)	24.06.2019

Заведующий отделом  
«Коллекция микроорганизмов»



Пьянков О.В.

«24» 03 2021