

На правах рукописи

МАРЧЕНКО ВАСИЛИЙ ЮРЬЕВИЧ

**Мониторинг высокопатогенного вируса гриппа птиц на территории
Российской Федерации**

1.5.10 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Кольцово – 2021

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный консультант: Ильичева Татьяна Николаевна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: Ирза Виктор Николаевич, доктор ветеринарных наук, доцент, главный научный сотрудник ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Хаснатинов Максим Анатольевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

Игнатьев Георгий Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, руководитель кафедры иммунобиохимии ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток» ФМБА России

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «25» марта 2022 г. в 09-00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. по адресу: 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, тел.: +7(383) 363-47-00.

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

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Непомнящих Т.С.

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 А/Н5N1, А/Н5N2, А/Н5N3, А/Н5N5, А/Н5N6, А/Н5N8, 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 А/Н5N1, 455 из которых имели летальный исход. При этом, за период 2020 года новых случаев заражения человека вирусами А/Н5N1 выявлено не было. Также, вызывают опасение случаи заражения людей вирусом гриппа А/Н5N6. 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 А/Н7N9. Стоит отметить, что продолжают регистрироваться случаи заражения

человека вирусом гриппа А/Н9N2. 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 исследования:

Проведение мониторинга высокопатогенного вируса гриппа птиц среди животных и населения на территории Российской Федерации.

Задачи исследования:

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 работы.

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.

Основные 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 2016-2018гг.
3. В исследованный период (2013-2018 гг.) занос высокопатогенных и низкопатогенных вирусов гриппа на территорию Российской Федерации 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 исследования.

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.

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.

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. Максютину.

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Система мониторинга вируса 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 (рисунок 1).



Рисунок 1. 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.

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.

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 2.

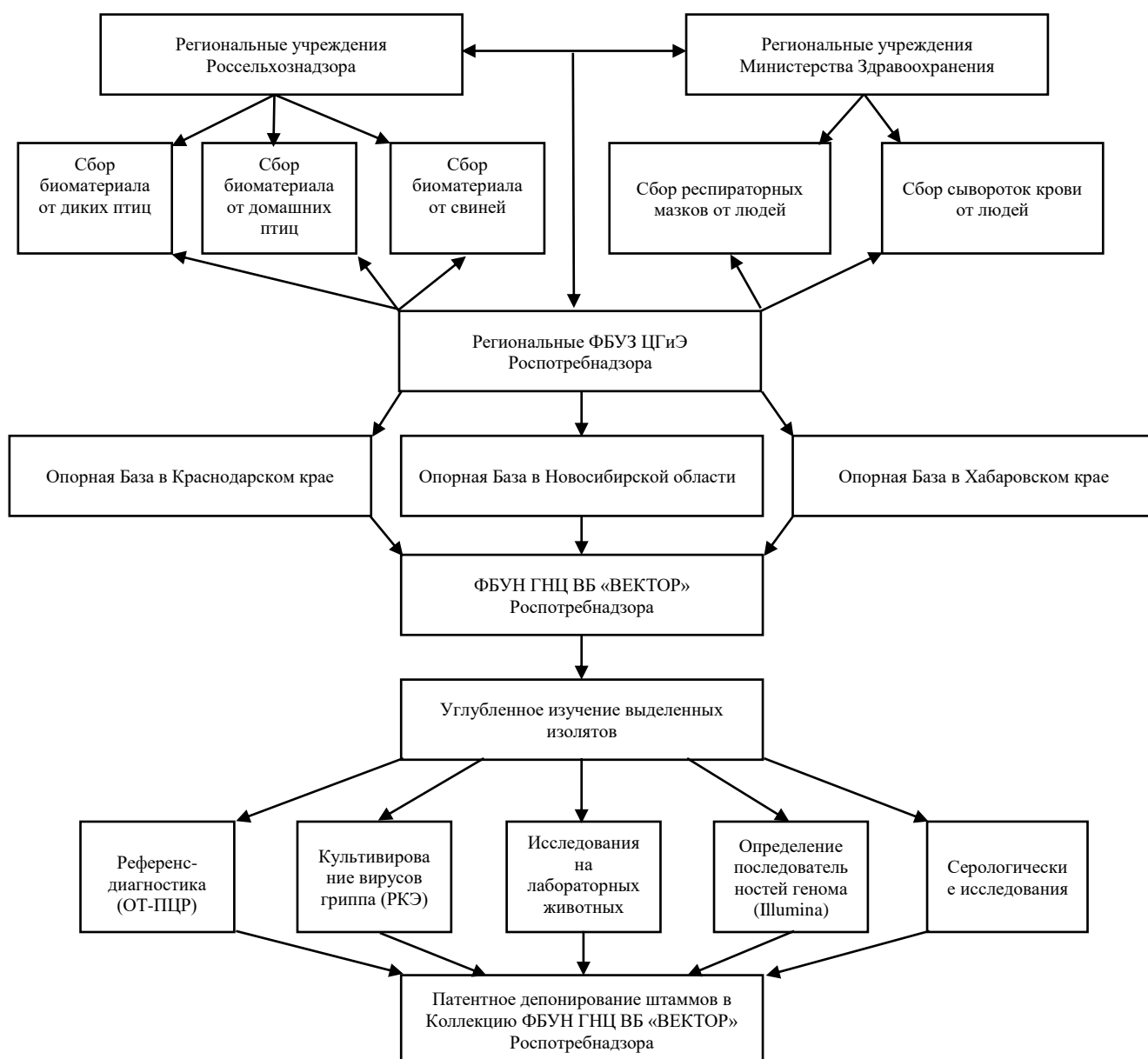


Рисунок 2. Схема проведения исследований в рамках мониторинга вируса гриппа птиц на территории России

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. 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 (n=746) и Омской областей (n=576), Алтайского края (n=400) и республики Саха-Якутия, тогда как на территориях Амурской, Кемеровской и Томской областей было собрано только по 9 образцов биологического материала от диких птиц. Биоматериала от людей, свиней или морских млекопитающих в 2013 году собрано не было.

В результате исследований было показано, что три образца являются положительными. 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.

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 (таблица 2). 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.

Количество собранного биоматериала на разных территориях различалось. Так, больше всего образцов было собрано на территориях республик Саха (Якутия) (n=835) и Коми (n=579), а также Приморского (n=709) и Краснодарского краев (n=765). Наименьшее количество проб было собрано на территориях Сахалинской области (n=12) и Ханты-Мансийского автономного округа (n=21). 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.

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 (ЭИД₅₀/мл) (таблица 1).

Таблица 1. Биологические свойства выделенных штаммов вируса гриппа А

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занамивира/ озельтамивира
			РКЭ	Мыши линии Balb/c		
			lgЭИД ₅₀ /мл, (M±Sm)*	ИД ₅₀ , lgЭИД ₅₀ /мл, (M±Sm)*	ЛД ₅₀ , lgЭИД ₅₀ /мл, (M±Sm)*	IC50, nM
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. 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.						

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 инфекционной дозы (ИД₅₀). При этом штамм вируса гриппа А/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 свиязи (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/мл.

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 ЭИД50, что указывает на наличие вирулентности исследуемого штамма для мышей.

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 таблица 2.

Как видно из таблицы, ни одна из референс-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.

Таблица 2. 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

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

Анализ сайта протеолитического расщепления гемагглютинина выявил аминокислотную последовательность PLRERRRKRLGF, которая является полиосновным сайтом протеолитического расщепления гемагглютинина, 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 (рисунок 3, 4).

Филогенетическое дерево гена НА выделенного штамма и штаммов других подтипов H5 указало на его принадлежность к генетической кладе 2.3.4.4 (рисунок 3).

В результате анализа последовательности гена НА была выявлена замена, расположенная в сайте связывания антител, что указывает на антигенный дрейф гемагглютинина 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.

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 nM, занамивира – 0,33 nM, что по критериям ВОЗ позволяет отнести этот штамм к разряду высокочувствительных к ингибиторам нейраминидазы. Полученные данные имеют важное значение для оценки возможного пандемического риска циркулирующего вируса гриппа A(H5N8).

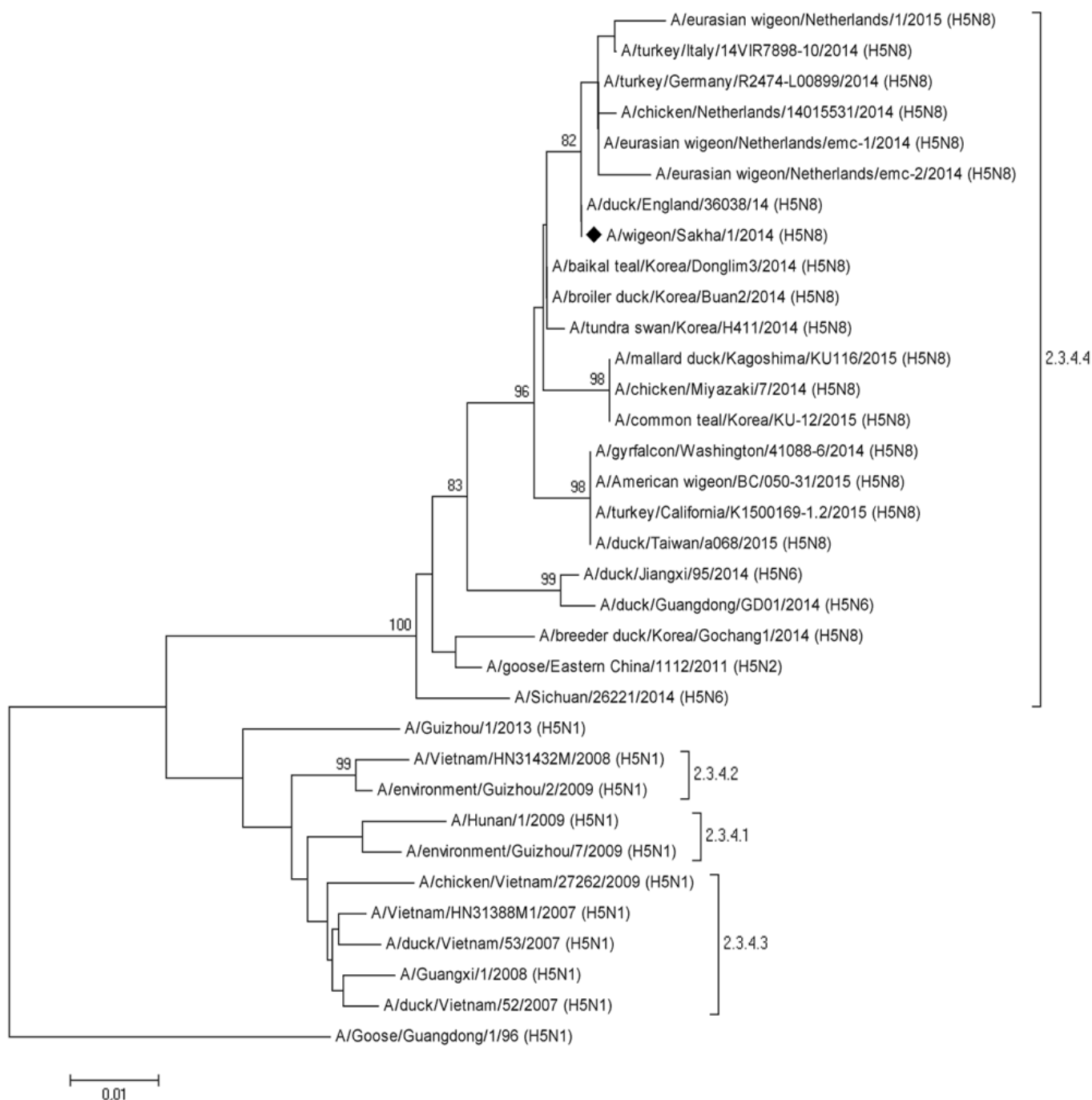


Рисунок 3. Филогенетическое дерево гена гемагглютинина HA(A) штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8). Дерево построено при помощи программы MEGA 5.0 (www.megasoftware.net/) с использованием метода minimum evolution (1000 повторов).

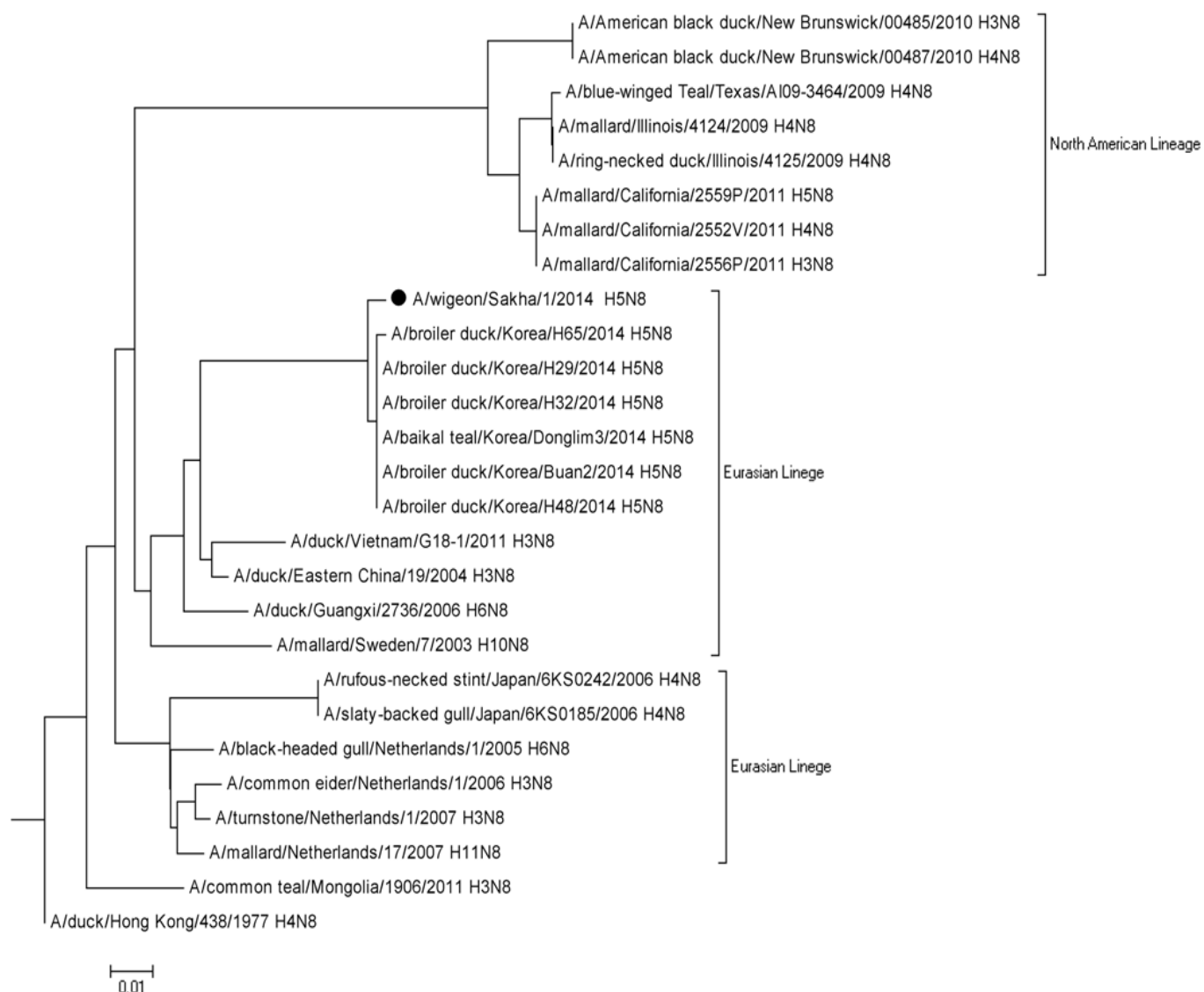


Рисунок 4. Филогенетическое дерево гена нейраминидазы (NA) штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8). Дерево построено при помощи программы MEGA 5.0 (www.megasoftware.net/) с использованием метода minimum evolution (1000 повторов).

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. 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.

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. 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 (n=798) и Татарстан (n=773), Ямало-Ненецкого автономного округа (n=708) и Омской области (n=604), 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.

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 (таблица 3).

Таблица 3. Биологические характеристики вирусов гриппа H5N1

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занамивира/ озельтамивира
			РКЭ	Мыши линии Balb/c		
			lgЭИД ₅₀ /мл, (M±Sm)*	ИД ₅₀ , lgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	ЛД ₅₀ , lgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	IC50, nM
Ранее выделенные штаммы						
	A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	6.2 ± 0.5	2.9 ± 0.4	4.1 ± 0.4	1.00/0.33
Исследуемые штаммы						
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. 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.						

Штаммы были выделены на 10-дневных развивающихся куриных эмбрионах и показали высокую степень продуктивности, а также высокие значения показателей инфекционности и вирулентности для млекопитающих (мыши). Так, в среднем, при титровании на РКЭ инфекционный титр вируса составил 8,9 lg ЭИД50/мл. Для дальнейшего изучения и сравнения были выбраны три штамма из трех регионов Новосибирской области.

При интраназальном заражении мышей линии Balb/c показатели ЛД50 составили 2,8, 2,7 и 3,6 lgЭИД50/мл 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.

Антигенные свойства штаммов были изучены в реакции торможения гемагглютинации (таблица 4). 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 4. 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/Tyva/120/2009	A/rook/Chany/32/2015	A/Hong Kong/2013/2003	A/duck/Hunan/795/2002	A/duck/Tuva/01/2006	A/barheaded	A/duck/Hunan/101/2004	A/chicken/Primorje/1/2008	A/Muscovy duck/Vietnam/1155/2006	A/Japanese white-gull/HK/1029/2006
			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/Tyva/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). Филогенетический анализ гена НА изучаемых штаммов показал принадлежность данных

штаммов к генетической кладе 2.3.2.1с. и тесное родство с группой кандидатного вакцинного штамма A/Alberta/1/2014 (H5N1), рекомендованного ВОЗ в 2015 году (Рисунок 5).

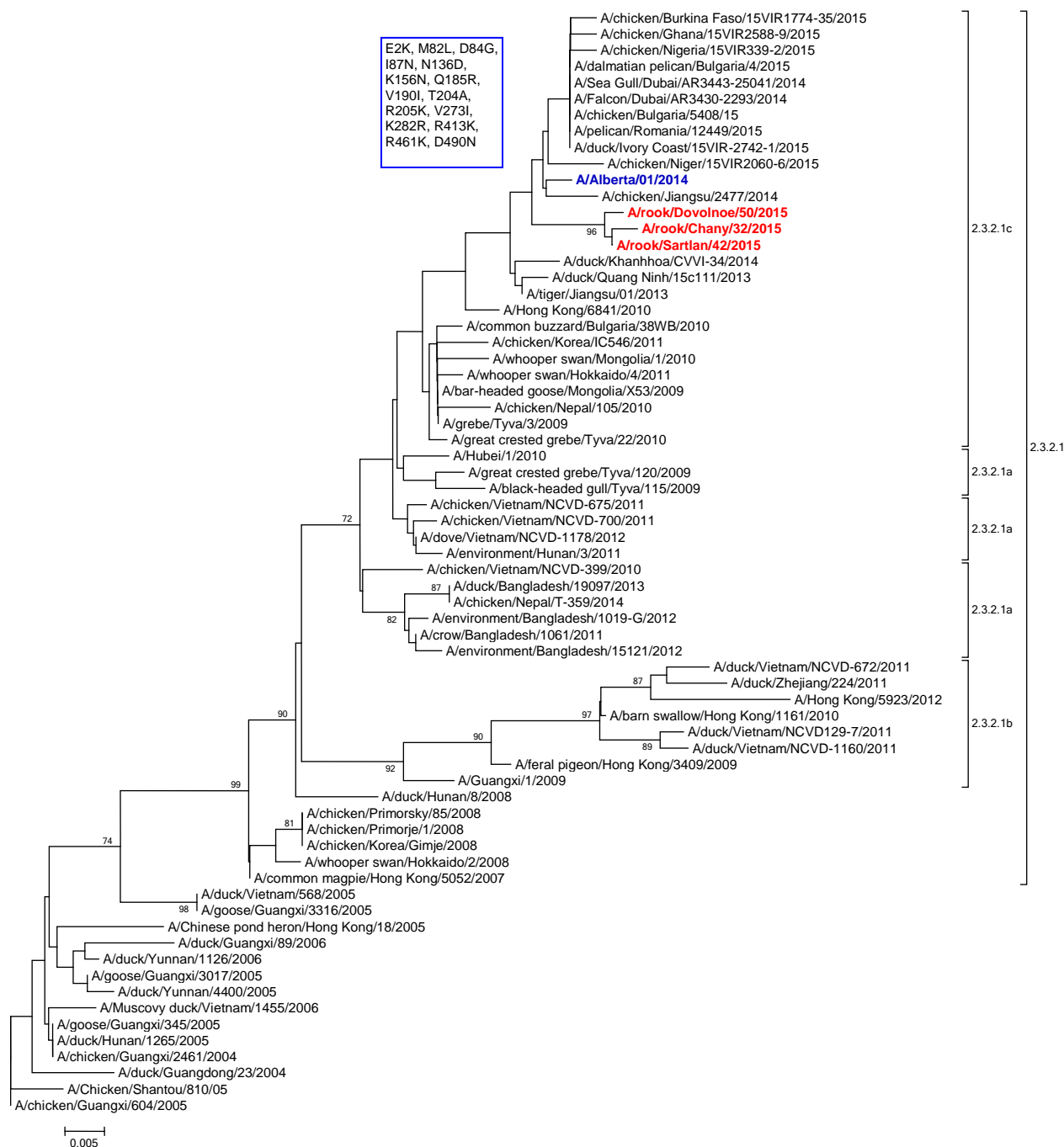


Рисунок 5. Филогенетическое дерево гена HA1 штаммов вируса гриппа A(H5N1). Штаммы, выявленные в Новосибирской области выделены красным. Замены в аминокислотной последовательности HA выделенных штаммов, имеющие связь с референс штаммом A/Hubei/1/2010 (выделен синим), показаны в рамке. Филогенетическое дерево было построено с помощью программного обеспечения MEGA версии 5.2 (www.megasoftware.net/) с использованием метода neighbor-joining (1,000 повторов) с Kimura 2-parameter model.

Анализ последовательности гемагглютини́на (НА) 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 НА - 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 (НА) в позициях 41 и 135, которые, по литературным данным, отвечают за устойчивость к лекарственным препаратам (таблица 5). Чувствительность исследуемых штаммов к ингибиторам нейраминидазы подтверждается результатами исследования нейраминидазной активности при помощи флуорометрического метода (Fluorometric Neuraminidase Inhibition Assay). Так, 50% ингибирующая доза (IC50) занамивира/озельтамивира в отношении изучаемых штаммов составила 0,35/0,55 nM для штамма A/rook/Chany/32/2015 и 0,39/0,42 nM и 0,49/0,33 nM для штаммов A/rook/Sartlan/42/2015, A/rook/Dovolnoe/50/2015 соответственно.

Следует отметить, что изученные нами штаммы имеют незначительные антигенные отличия, 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 5. Мутации, выявленные в генах НА и NA штаммов вируса гриппа A(H5N1) в сравнении с кандидатным вакцинным штаммом A/Hubei/1/2010(H5N1)

Штамм	а.к. замена в гене НА																
	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

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.

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 в количестве 20 проб был собран только на территории Магаданской области.

В 2016 году мониторинг вируса гриппа птиц осуществлялся на территории 32 регионов Российской Федерации. Наибольшее количество проб биоматериала было собрано на территориях Приморского (n=1262) и Забайкальского краев (n=1221), в республике Бурятия (n=1028) и Оренбургской области (n=1012). Наименьшее количество проб было собрано на территориях Хабаровского края (n=39), Сахалинской области (n=35) и республики Коми (n=10).

В результате исследования в 26 образцах было выявлено наличие вирусов гриппа А. 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 в Астраханской области. 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 (таблица 6).

Таблица 6. Биологические свойства некоторых выделенных штаммов вируса гриппа А

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занамивира/ озельтамивира
			РКЭ	Мыши линии Balb/c		
			IgЭИД ₅₀ /мл, (M±Sm)*	ИД ₅₀ , IgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	ЛД ₅₀ , IgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	IC50, nM
Ранее выделенные штаммы						
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
Исследуемые штаммы						
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/wild duck/Tyva/35/2016	H5N8	7,9 ± 0.4	1.9 ± 0.6	2.2± 0.5	1.4/0.8
4.	A/great crested grebe/Tyva/34/2016	H5N8	9,3 ± 0.3	1.7 ± 0.5	2.3± 0.5	1.0/0.7
5.	A/garganey/Altai/2092/2016	H5N8	8.0 ± 0.6	2.0 ± 0.4	2.9 ± 0.6	0,75/0,75
6.	A/gadwall/Kurgan/2442/2016	H5N8	7.6 ± 0.4	2.1 ± 0.4	3.0 ± 0.5	0,55/0,53
7.	A/mallard/Toguchin/1154/2016	H6N1	8.6 ± 0.4	>5.0	>5.0	0,69/0,53
8.	A/teal/Toguchin/1157/2016	H6N1	8.4 ± 0.4	>5.0	>5.0	1,14/0,62
9.	A/teal/Toguchin/1156/2016	H6N1	8.5 ± 0.3	>5.0	>5.0	1,9/0,11
10.	A/teal/Toguchin/1153/2016	H6N1	9.1 ± 0.5	>5.0	>5.0	1,85/0,11
11.	A/wild duck/Tatarstan/3059/2016	H5N8	8.6 ± 0.4	2.0 ± 0.3	2.9 ± 0.4	0.58/0.29
12.	A/environment/Kamchatka/117/2016	H13N8	7.3 ± 0.5	5.2 ± 0.2	>5.0	0,82/0,7
13.	A/environment/Kamchatka/18/2016	H5N5	9.0 ± 0.5	2.8 ± 0.4	4.4 ± 0.5	2,39/0,81
14.	A/chicken/Kalmykia/2643/2016	H5N8	7.6 ± 0.4	2.0 ± 0.4	2.9 ± 0.6	0.60/0.28
15.	A/chicken/Astrakhan/3109/2016	H5N8	8,4 ± 0.5	1.9 ± 0.4	2.4 ± 0.5	0.59/0.28
16.	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 ₅₀ – 50 % эмбриональная инфицирующая доза; ИД ₅₀ - 50 % инфицирующая доза для мышей линии Balb/c; ЛД ₅₀ – 50 % летальная доза для мышей линии Balb/c; IC ₅₀ – 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 lgЭИД₅₀/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 гемагглютиниона, что характерно для высокопатогенных штаммов вируса гриппа.

Также, изученные штаммы показали высокую степень вирулентности для мышей. При интраназальном заражении мышей Balb/c показатели ИД50 находились в диапазоне 1,7 – 2,1 lgЭИД50/мл. Также, для штаммов были определены значения ЛД50, которые составили 2,2 – 3,0 lgЭИД50/мл. 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.

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 (табл. 7).

Таблица 7. 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
Исследуемые 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

При этом, выделенные штаммы 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.

Полученные данные согласуются с проведенным филогенетическим анализом, который также подтвердил, что изучаемые штаммы подтипа H5N8 относятся к генетической кладе 2.3.4.4 (рисунок 6).

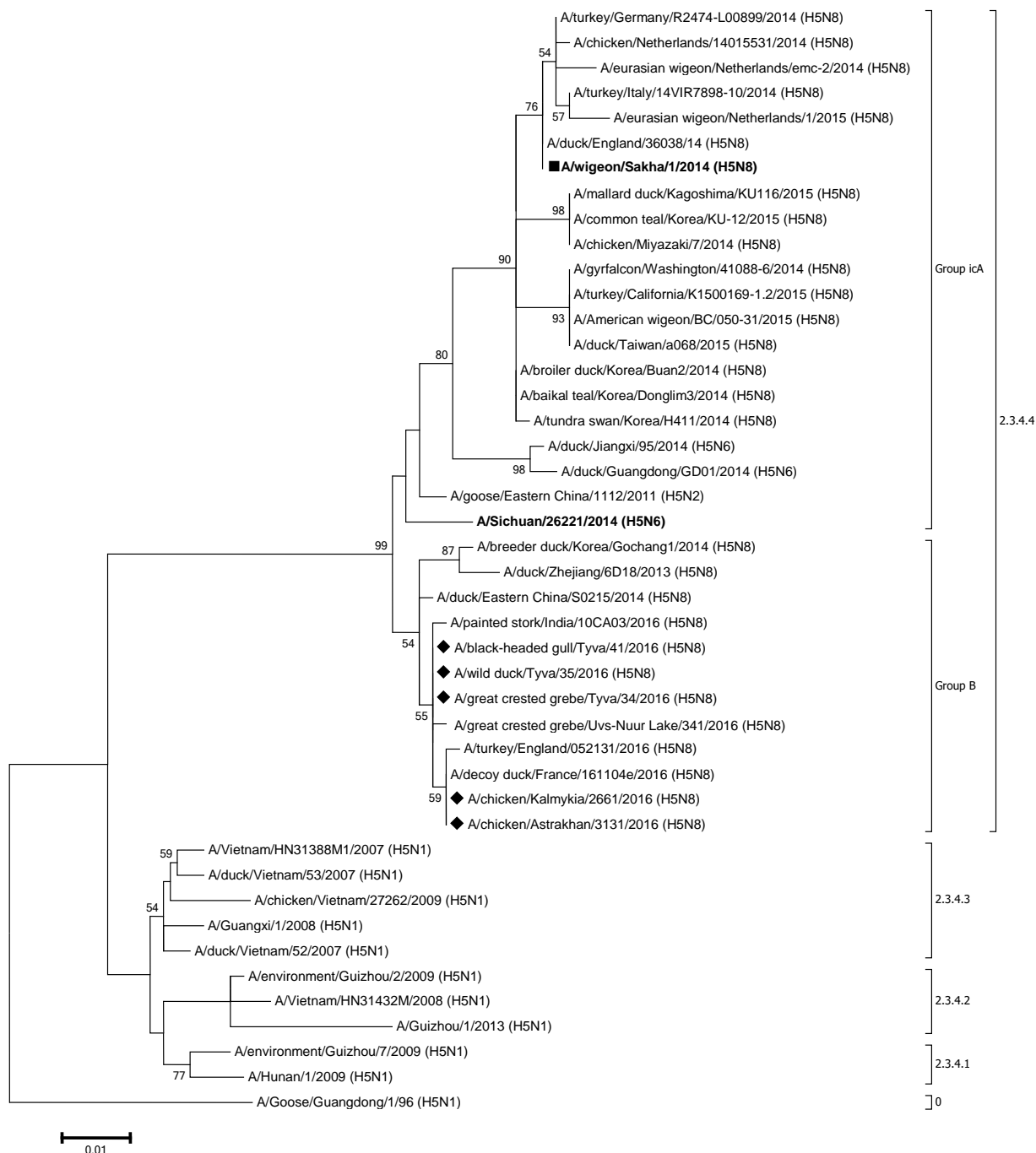


Рисунок 6. Филогенетическое дерево гена НА вирусов гриппа H5Nx подтипа. Штаммы, выделенные в 2016 г. отмечены ромбами. Штамм, выделенный в 2014 году отмечен квадратом. Кандидатный вакцинный штамм выделены жирным шрифтом.

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. 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>).

У изученных штаммов был выявлен ряд мутаций, отвечающих за вирулентность и изменение хозяйской специфичности (таблица 8). Так, при анализе аминокислотной последовательности НА 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 (таблица 10). Также в белке М2 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 8. Аминокислотные различия в гене НА между выделенными штаммами и кандидатным вакцинным штаммом клады 2.3.4.4 A/Sichuan/26221/2014(H5N6)

Штамм	а.к. замена в гене НА											
	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 (А(Н13N8), А(Н6N1), А(Н5N5)). 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.

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.

Всего за 2017 год мониторинг вируса гриппа был осуществлен на территории 36 региональных ФБУЗ ЦГиЭ, при этом, сбор биоматериала от морских млекопитающих в 2017 году не осуществлялся

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/H5N8 снова вызвал гибель домашних кур на частных подворьях Ростовской области. В это же время было выделено 5 изолятов высокопатогенного вируса гриппа А/H5N2 от павших птиц во время вспышки в Костромской области.

В 2017 году были изучены биологические характеристики штаммов вируса гриппа А/H5Nx, выделенных в 2017 году в сравнении с ранее выделенными штаммами (таблица 9).

Таблица 9. Биологические свойства некоторых выделенных штаммов вируса гриппа А

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занамивира/ озельтамивира
			РКЭ	Мыши линии Balb/c		
			IgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	ИД ₅₀ , IgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	ЛД ₅₀ , IgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	IC50, nM
Ранее выделенные штаммы						
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/Tyva/34/2016	H5N8	9.3 ± 0.3	1.7 ± 0.5	2.3± 0.5	1.0/0.7
4	A/environment/Kamchatka/18/2016	H5N5	9.0 ± 0.5	2.8 ± 0.4	4.4 ± 0.5	2,39/0,81
Исследуемые штаммы						
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/mute swan/Krasnodar/26/2017	H5N8	8.6 ± 0.4	1.9 ± 0.4	2.7 ± 0.6	3.12/0.52
3.	A/turkey/Rostov/10/2017	H5N8	8.7 ± 0.4	2.2 ± 0.4	2.9 ± 0.5	0,91/0,62
4.	A/long-eared owl/Voronezh/15/2017	H5N8	8,0± 0.5	2.2 ± 0.5	2.9 ± 0.6	0.76/0.66
5.	A/mute swan/Kaliningrad/131/2017	H5N8	8.6 ± 0.7	2.2 ± 0.5	2.8 ± 0.4	0,79/0,84
6.	A/chicken/Shchyolkovo/47/2017	H5N8	8.8 ± 0.3	1.9 ± 0.4	3.1 ± 0.5	0,75/0,65
7.	A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017	H5N8	9.2 ± 0.6	1.9 ± 0.4	2.9 ± 0.6	0,49/0,41
8.	A/chicken/Tatarstan/88/2017	H5N8	8.7 ± 0.4	2.0 ± 0.4	2.4 ± 0.4	0,75/0,75
9.	A/chicken/Tatarstan/112/2017	H5N8	7.9 ± 0.6	2.3 ± 0.4	2.7 ± 0.6	1,66/35,33
10.	A/turkey/Perm/7887/2017	H5N8	7.5 ± 0.5	2.2 ± 0.4	2.8 ± 0.4	0,36/0,42
11.	A/chicken/Mari El/236/2017	H5N8	8.7 ± 0.4	2.2 ± 0.5	2.7 ± 0.4	1/0,83
12.	A/chicken/Rostov-on-Don/1321/2017	H5N8	8.6 ± 0.4	2.2 ± 0.5	2.8 ± 0.4	0,69/0,53
13.	A/chicken/Rostov-on-Don/1598/2017	H5N8	8.2 ± 0.3	2.4 ± 0.4	3.0 ± 0.6	0,67/0,45
14.	A/chicken/Kostroma/1718/2017	H5N2	8.9 ± 0.4	1.54 ± 0.6	1.83 ± 0.6	1,69/0,12
15.	A/swine/Irkutsk/155/2017	H3N2	7.2 ± 0.3	>5,0	>5,0	2.23/0.13
16.	A/swine/Irkutsk/158/2017	H3N2	6.8 ± 0.4	>5,0	>5,0	2.90/0.18
17.	A/swine/Irkutsk/182/2017	H3N2	7.0 ± 0.3	>5,0	>5,0	2.29/0.15
18.	A/mallard/Khabarovsk/241/2017	H10N6	8,1±0,5	>5,0	>5,0	0,63/0,15
19.	A/mallard/Toguchin/19/2017	H4N6	7,8±0,4	>5,0	>5,0	0,95/0,27
20.	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 культивировании в 10-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 IgЭИД₅₀/мл. Показатели инфекционности вновь выделенных штаммов оказались сопоставимы с показателями штамма A/great crested grebe/Tyva/34/2016 (H5N8), выделенного в мае 2016 года до начала масштабной эпизоотии в России, и были выше показателей инфекционности штаммов A/environment/Kamchatka/18/2016 (H5N5) и A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8), циркулировавших ранее.

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 показатели ИД₅₀

находились в диапазоне 1,54 – 2,4 lgЭИД50/мл. Также, для штаммов были определены значения ЛД50, которые составили 1,83 – 3,1 lgЭИД50/мл.

Антигенные свойства выделенных штаммов с использованием референс антигенов и сывороток крови хорьков, полученных на референс антигены, а также на антигены ранее выделенных в России штаммов вируса гриппа H5 (таблица 10). 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 10. 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
			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
Референс антигены		Обратные титры антител								
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/Nothorn 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
Исследуемые антигены										
A/goose/Krasnodar/3144/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640	640
A/mute swan/Krasnodar/26/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	320
A/turkey/Rostov/10/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	640	640	640
A/long-eared owl/Voronezh/15/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	320	5120	5120	320	640	640	640
A/mute swan/Kaliningrad/131/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640	640
A/chicken/Shchyolkovo/47/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	320
A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	640
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/chicken/Mari El/236/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	640	1280	640	640
A/chicken/Rostov-on-Don/1321/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640	640
A/chicken/Rostov-on-Don/1598/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	640	1280	640	640
A/chicken/Kostroma/1718/2017	H5N2	2.3.4.4	<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 (рисунок 7). 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 был выявлен ряд мутаций – N46K в НА, N205S в белке NS1, A337T и K615R в белке PA, влияющих на антигенные свойства вирусов, вирулентность и хозяйскую специфичность вирусов гриппа (таблица 11, 12).

Таблица 11. Аминокислотные различия в гене НА между выделенными штаммами и кандидатным вакцинным штаммом клады 2.3.4.4 A/Sichuan/26221/2014(H5N6)

Штамм	а.к. замена в гене НА													
	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 12. Аминокислотные различия в гене НА 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	-	
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	-	

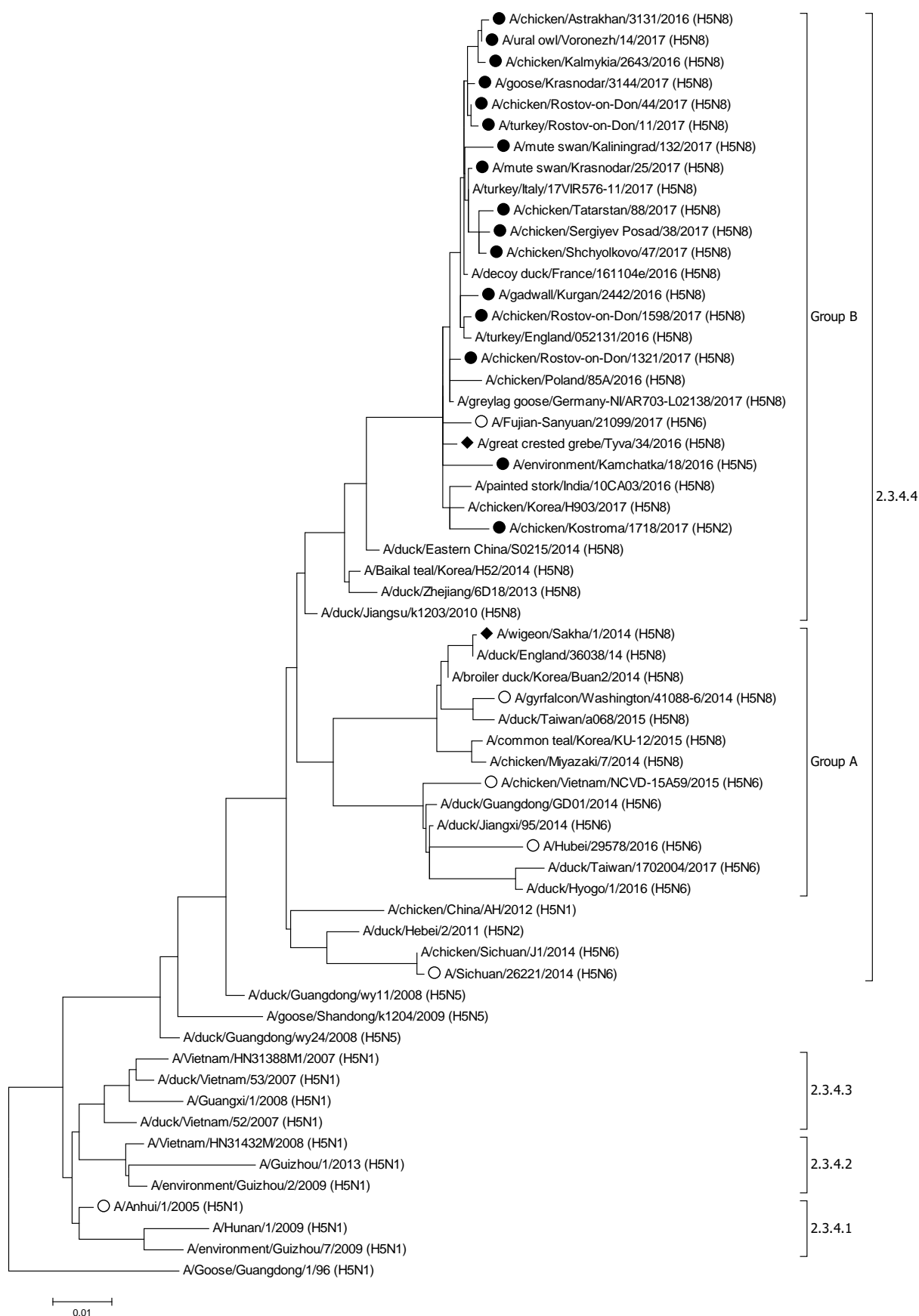


Рисунок 7. Филогенетическое дерево гена НА вирусов А(Н5Nх). Штаммы, выделенные в России в 2016 году выделены черными кругами, ранее выделенный штамм А(Н5N8) выделен черным ромбом. Кандидатные вакцинные штаммы клады 2.3.4.4 выделены белыми кругами.

В НА 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 (таблица 9).

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

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 высокопатогенных 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.

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. 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.

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.

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. 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.

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 (таблица 13).

Таблица 13. Биологические свойства некоторых вирусов гриппа Н5-подтипа

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занавируса/озельтамивируса
			РКЭ	Мыши линии Balb/c		
			lgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	ИД ₅₀ , lgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	ЛД ₅₀ , lgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	IC50, nM
	Ранее выделенные штаммы					
	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/Tyva/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
	Изучаемые штаммы					
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/Samara/446/2018	H5N8	8.6 ± 0.7	2.2 ± 0.5	3.0 ± 0.4	0,54/0,44
5.	A/chicken/Samara/447/2018	H5N8	8.7 ± 0.4	н/д	н/д	0,52/0,40
6.	A/duck/Samara/452/2018	H5N8	9.1 ± 0.4	2.1 ± 0.5	3.1 ± 0.6	0,43/0,41
7.	A/goose/Samara/455/2018	H5N8	8.7 ± 0.4	н/д	н/д	0,41/0,39
8.	A/goose/Samara/459/2018	H5N8	9,3 ± 0.3	н/д	н/д	0,45/0,44
9.	A/chicken/Penza/300/2018	H5N8	9.3 ± 0.3	2.4 ± 0.5	3.7 ± 0.6	0,42/0,38
10.	A/chicken/Penza/301/2018	H5N8	9.2 ± 0.3	н/д	н/д	0,59/0,62
11.	A/chicken/Orel/533/2018	H5N8	8.7 ± 0.4	2.4 ± 0.5	3.3 ± 0.5	0,73/0,65
12.	A/chicken/Rostov-on-Don/766/2018	H5N8	9.1 ± 0.4	н/д	н/д	0,63/0,78
13.	A/turkey/Rostov-on-Don/817/2018	H5N8	8.7 ± 0.4	н/д	н/д	0,40/0,39
14.	A/chicken/Cheboksary/805/2018	H5N8	9.5 ± 0.5	3.3 ± 0.5	4.6 ± 0.4	0,35/0,38
15.	A/chicken/Cheboksary/806/2018	H5N8	9.2 ± 0.3	н/д	н/д	0,44/0,33
16.	A/chicken/Cheboksary/849/2018	H5N8	9.0 ± 0.5	н/д	н/д	0,36/0,40
17.	A/chicken/Mari El/870/2018	H5N8	9.3 ± 0.4	3.6 ± 0.4	4.2 ± 0.4	0,44/0,43
18.	A/turkey/Rostov-on-Don/1117/2018	H5N8	9.0 ± 0.4	н/д	н/д	0.77 / 0.46
19.	A/chicken/Voronezh/1488/2018	H5N8	8.6 ± 0.4	н/д	н/д	0.61 / 0.52
20.	A/chicken/Voronezh/1491/2018	H5N8	9.3 ± 0.5	н/д	н/д	1.30 / 0.68
21.	A/turkey/Rostov-on-Don/04/2018	H5N8	8.7 ± 0.4	н/д	н/д	1.25 / 0.80
22.	A/turkey/Rostov-on-Don/05/2018	H5N8	9.1 ± 0.4	н/д	н/д	1.29 / 0.64
23.	A/common gull/Saratov/1676/2018	H5N6	8.9 ± 0.6	2.4 ± 0.5	>7.0	1.81 / 0.53

Примечание: *- М – 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.

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 гемагглютинаина, что характерно для высокопатогенных штаммов вируса гриппа. Также, изученные штаммы показали высокую степень вирулентности для мышей. При интраназальном заражении мышей Balb/c показатели инфекционной дозы находились в диапазоне 2,1 – 3,6 lgЭИД50/мл. Также, для штаммов были определены значения ЛД50, которые составили 3,1 – 4,6 lgЭИД50/мл. Показатели вирулентности для изученных штаммов были сопоставимы с показателями штаммов вируса гриппа H5Nx, выделенных ранее, что может свидетельствовать о сохранении высокопатогенных свойств циркулирующих на территории России вирусов гриппа H5N8.

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 ЭИД50/мл.

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

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 (таблица 14).

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) (рисунок 8). 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 вирусов клады 2.3.4.4.

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.

Таблица 14. 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
Референс антигены			Обратные итры антители									
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
Исследуемые антигены												
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/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	2.3.4.4	<20	640	10240	5120	320	640	640	320	2560	<20
A/goose/Samara/455/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	320	10240	2560	320	640	640	320	1280	<20
A/goose/Samara/459/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	5120	320	1280	1280	320	2560	<20
A/chicken/Penza/300/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	10240	5120	320	1280	1280	640	5120	<20
A/chicken/Penza/301/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	5120	640	1280	1280	640	5120	<20
A/chicken/Orel/533/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	320	10240	2560	320	1280	640	320	2560	<20
A/chicken/Rostov-on-Don/766/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	320	5120	1280	320	320	320	160	1280	<20
A/turkey/Rostov-on-Don/817/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	320	5120	2560	320	640	320	320	1280	<20
A/chicken/Cheboksary/805/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	5120	320	1280	1280	640	5120	<20
A/chicken/Cheboksary/806/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	5120	320	1280	640	320	2560	<20
A/chicken/Cheboksary/849/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	320	5120	1280	160	640	320	160	1280	<20
A/chicken/Mari El/870/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	10240	5120	640	1280	640	640	2560	<20
A/turkey/Rostov-on-Don/1117/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	5120	640	1280	1280	640	2560	<20
A/chicken/Voronezh/1488/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	320	5120	2560	320	640	640	320	1280	<20
A/chicken/Voronezh/1491/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	2560	320	1280	640	640	2560	<20
A/turkey/Rostov-on-Don/04/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	2560	320	1280	640	320	2560	<20
A/turkey/Rostov-on-Don/05/2018	H5N8	2.3.4.4	<20	640	10240	2560	320	1280	640	320	2560	<20

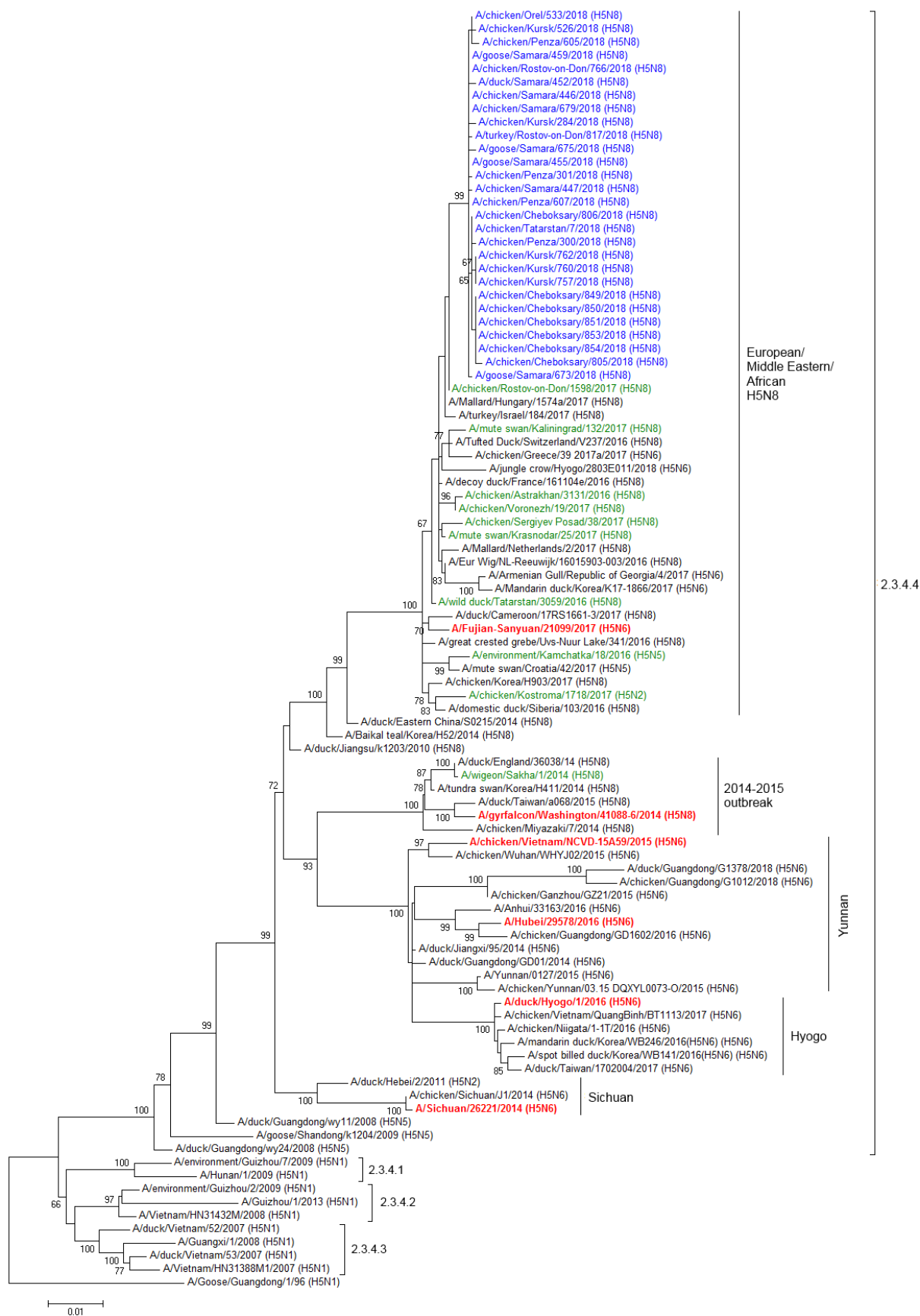


Рисунок 8. Филогенетический анализ гена НА штаммов вируса гриппа Н5. Исследуемые штаммы выделены синим. Кандидатные вакцинные штаммы выделены красным. Штаммы, выделенные в России до 2018 г. отмечены зеленым. Дерево построено с помощью программы MEGA 6.06 (<http://www.megasoftware.net/>), используя метод maximum likelihood с 500 bootstrap повторами.

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 степень репродукции. Титр вируса в аллантоисной жидкости находился в диапазоне 8,9 – 9,1 lg ЭИД₅₀/мл. При интраназальном заражении мышей Balb/c штаммы оказались не патогенными и не инфекционными для данных лабораторных животных. Также, все изученные штаммы были чувствительны к действию противовирусных препаратов (таблица 15).

Таблица 15. Биологические свойства вирусов гриппа A/H5 и A/H9N2.

№	Штамм	подтип	Титр вируса			Ингибирующая концентрация занамивира/озельтамивира
			РКЭ	Мыши линии Balb/c		
			lgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	ИД ₅₀ , lgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	ЛД ₅₀ , lgЭИД ₅₀ /мл (M±Sm)*	IC50, nM
	Референс штаммы					
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
	Изучаемые штаммы					
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: *- М – 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.						

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 16, 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 (рисунок 9).

Таблица 16. 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)
Референс антиген			Обратные итры антители	
A/Hong Kong/308/2014	H9N2	Y280	320	320
Исследуемые антигены				
A/chicken/Primorsky Krai/03/2018	H9N2	Y280	2560	2560
A/chicken/Primorsky Krai/1771/2018	H9N2	Y280	1280	1280
A/chicken/Primorsky Krai/05/2018	H9N2	Y280	2560	2560

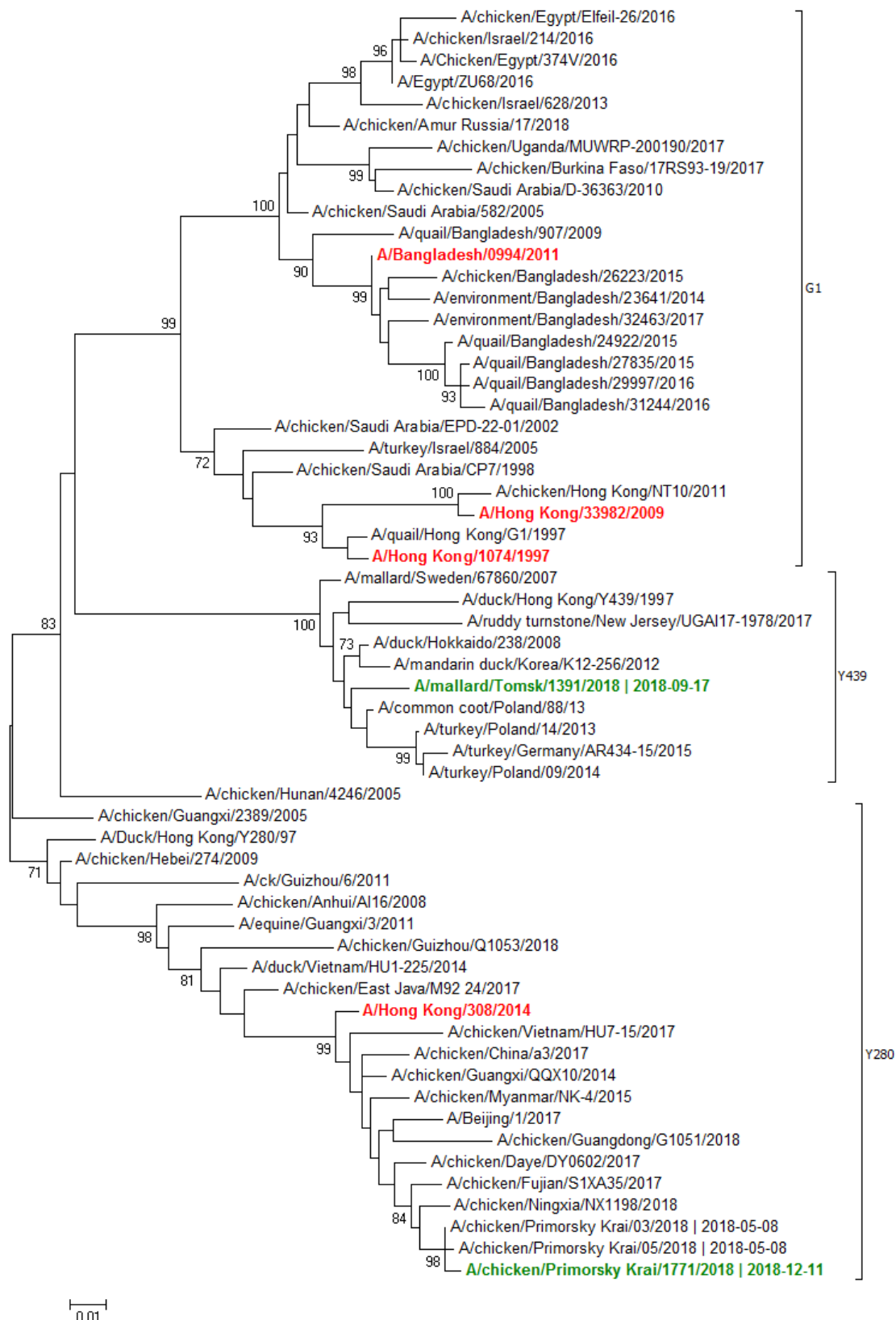


Рисунок 9. Филогенетический анализ гена НА вирусов гриппа А(Н9N2). Штаммы, выделенные в России, выделены зеленым. Кандидатные вакцинные штаммы выделены красным.

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 A/H9N2 трех различных генетических линий.

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 была 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.

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.

Серологический мониторинг вируса гриппа птиц

В 2016-2018 гг. 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 (таблица 17).

Таблица 17. 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

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.

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).

Таким образом, исследования 289 образцов сывороток крови от людей, контактировавших с павшей или больной птицей, показали наличие антител к вирусам гриппа подтипов Н5N1 и Н5N8 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.

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 более чем 20 тысяч особей диких птиц из которых 15397 были определены до вида (таблица 18).

Таблица 18. Видовой состав и количество особей диких птиц, добытых в 2013-2018г. на территории Российской Федерации

Отряд	Семейство	Кол-во видов	Кол-во особей	Кол-во выделенных
Гусеобразные (<i>Anseriformes</i>)	Утиные (<i>Anatidae</i>)	28	8243	25
Ржанкообразные (<i>Charadriiformes</i>)	Бекасовые (<i>Scolopacidae</i>)	14	648	11
	Чайковые (<i>Laridae</i>)	10	2489	
	Ржанковые (<i>Charadriidae</i>)	3	191	
	Кулики-сороки (<i>Haematopodidae</i>)	1	124	
Воробьинообразные (<i>Passeriformes</i>)	Врановые (<i>Corvidae</i>)	6	2479	5
	Дроздовые (<i>Turdidae</i>)	2	40	
	Воробьиные (<i>Passeridae</i>)	1	32	
	Поползневые (<i>Sittidae</i>)	1	16	
	Синицевые (<i>Paridae</i>)	1	22	
	Скворцовые (<i>Sturnidae</i>)	1	25	
	Трясогузковые (<i>Motacillidae</i>)	1	25	
Гагарообразные (<i>Gaviiformes</i>)	Гагаровые (<i>Gavia</i>)	1	11	
Аистообразные (<i>Ciconiiformes</i>)	Цаплевые (<i>Ardeidae</i>)	2	36	2
Журавлеобразные (<i>Gruiformes</i>)	Журавлиные (<i>Gruidae</i>)	1	49	1
	Пастушковые (<i>Rallidae</i>)	1	492	
Поганкообразные (<i>Podicipediformes</i>)	Поганковые (<i>Podicipedidae</i>)	1	127	1
Олушеобразные (<i>Suliformes</i>)	Баклановые (<i>Phalacrocoracidae</i>)	2	97	
Ястребообразные (<i>Accipitriformes</i>)	Ястребиные (<i>Accipitridae</i>)	2	35	
Соколообразные (<i>Falconiformes</i>)	Соколиные (<i>Falconidae</i>)	1	3	
Курообразные (<i>Galliformes</i>)	Фазановые (<i>Phasianidae</i>)	3	143	
Голубеобразные (<i>Columbiformes</i>)	Голубиные (<i>Columbidae</i>)	2	67	
Совообразные (<i>Strigiformes</i>)	Совиные (<i>Strigidae</i>)	3	3	3
Всего: 13 отрядов	33 семейств	88 видов	15397 особей	

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.

За весь период исследования от диких птиц было выделено 48 штаммов вируса гриппа. 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 2016-2018 гг.

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 вирусывыделения 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.

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

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 2.3.4.4a, 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. **Марченко В.Ю.**, Суслопаров И.М., Колосова Н.П., Гончарова Н.И., Шиповалов А.В., Дурьманов А.Г., Ильичева Т.Н., Будацыренова Л.В., Иванова В.К., Игнатъев Г.А., Ершова С.Н., Тюляхова В.С., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б. Выделение высокопатогенного вируса гриппа А субтипа H5N8 на территории республики Саха (Якутия) // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2015. – № 28 (28). – С. 38–43.
2. **Marchenko V.Y.**, Susloparov I.M., Kolosova N.P., Goncharova N.I., Shipovalov A.V., Durymanov A.G., Ilyicheva T.N., Budatsirenova L.V., Ivanova V.K., Ignatyev G.A., Ershova S.N., Tulyahova V.S., Mikheev V.N., Ryzhikov A.B. Influenza A(H5N8) virus isolation in Russia, 2014 // Archives of Virology. – 2015. – Vol. 160, № 11. – P. 2857–2860.
3. **Марченко В.Ю.**, Суслопаров И.М., Шиповалов А.В., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б. Циркуляция высокопатогенного вируса гриппа птиц в России в 2014–2015 гг. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 1. – С. 48–54.
4. **Marchenko V.Y.**, Susloparov I.M., Kolosova N.P., Goncharova N.I., Shipovalov A.V., Ilyicheva T.N., Durymanov A.G., Chernyshova O.A., Kozlovskiy L.I., Chernyshova T.V., Pryadkina E.N., Karimova T.V., Mikheev V.N., Ryzhikov A.B. Highly pathogenic influenza H5N1 virus of clade 2.3.2.1c in Western Siberia // Archives of Virology. – 2016. – Vol. 161, № 6. – P. 1645–1649.
5. **Марченко В.Ю.**, Суслопаров И.М., Сапронова Н.Ю., Гончарова Н.И., Колосова Н.П., Евсеенко В.А., Святченко С.В., Пьянкова О.Г., Зиатдинов В.Б., Лиманская О.С., Джамбинов С.Д., Шендо Г.Л., Михеев В.Н., Максюттов Р.А., Рыжиков А.Б. Анализ штаммов вируса гриппа H5N8, вызвавших вспышки в России в 2016–2017 гг. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 3. – С. 68–74.
6. **Marchenko V.Y.**, Susloparov I.M., Komissarov A.B., Fadeev A., Goncharova N.I., Shipovalov A.V., Svyatchenko S.V., Durymanov A.G., Ilyicheva T.N., Salchak L.K., Svintitskaya E.P., Mikheev V.N., Ryzhikov A.B. Reintroduction of highly pathogenic avian influenza A/H5N8 virus of clade 2.3.4.4. in Russia // Archives of Virology. – 2017. – Vol. 162, № 5. – 1381–1385.
7. **Марченко В.Ю.**, Суслопаров И.М., Игнатъев В.Э., Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А., Рыжиков А.Б. Обзор ситуации по высокопатогенному вирусу гриппа птиц субтипа H5 в России в 2016–2017 гг. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 1. – С. 30–35.
8. Ilyicheva T.N., Durymanov A.G., Svyatchenko S.V., **Marchenko V.Y.**, Bakulina A.Y., Goncharova N.I., Kolosova N.P., Susloparov I.M., Pyankova O.G., Ryzhikov A.B., Maksyutov R.A., Sobolev I.A. Humoral immunity to influenza in an at-risk population and severe influenza cases in Russia in

2016–2017 // Archives of Virology. – 2018. – Vol. 163, № 10. – P. 2675–2685.

9. **Marchenko V.**, Goncharova N., Susloparov I., Kolosova N., Gudymo A., Svyatchenko S., Danilenko A., Durymanov A., Gavrilova E., Maksyutov R., Ryzhikov A. Isolation and characterization of H5Nx highly pathogenic avian influenza viruses of clade 2.3.4.4 in Russia // Virology. – 2018. – Vol. 525. – P. 216–223.
10. **Марченко В.Ю.**, Гончарова Н.И., Евсеенко В.А., Суслопаров И.М., Гаврилова Е.В., Максютлов Р.А., Рыжиков А.Б. Обзор эпидемиологической ситуации по высокопатогенному вирусу гриппа птиц в России в 2018 г. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 1. – С. 42–49.
11. Susloparov I.M., Goncharova N., Kolosova N., Danilenko A., **Marchenko V.**, Onkhonova G., Evseenko V., Gavrilova E., Maksutov R.A., Ryzhikov A. Genetic characterization of avian influenza A(H5N6) virus clade 2.3.4.4, Russia, 2018 // Emerging Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 25, № 12. – P. 2338–2339.
12. **Марченко В.Ю.**, Гончарова Н.И., Tran T.N., Trinh Kh.S., Nguyen N.Q., Гаврилова Е.В., Максютлов Р.А., Рыжиков А.Б. Обзор эпизоотологической ситуации по высокопатогенному вирусу гриппа птиц в России в 2019 г. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 2. – С. 31–37.
13. Svyatchenko S.V., Goncharova N.I., **Marchenko V.Y.**, Kolosova N.P., Shvalov A.N., Kovrizhkina V.L., Durymanov A.G., Onkhonova G.S., Tregubchak T.V., Susloparov I.M., Gudymo A.S., Ilyicheva T.N. An influenza A(H5N8) virus isolated during an outbreak at a poultry farm in Russia in 2017 has an N294S substitution in the neuraminidase and shows reduced susceptibility to oseltamivir // Antiviral Research. – 2021. – Vol. 191. – Art. no. 105079.

Тезисы всероссийских и международных научных конференций:

1. **Марченко В.Ю.**, Суслопаров И.М., Колосова Н.П., Гончарова Н.И., Шиповалов А.В., Дурьманов А.Г., Ильичева Т.Н., Будацыренова Л.В., Иванова В.К., Игнатъев Г.А., Ершова С.Н., Тюляхова В.С., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б. Выделение высокопатогенного вируса гриппа H5N8-субтипа на территории республики Саха (Якутия) // VI Региональная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы инфекционной патологии на Дальнем Востоке Российской Федерации» (Хабаровск, 6–7 октября 2015 г.).
2. Гудымо А.С., Данильченко Н.В., **Марченко В.Ю.**, Гончарова Н.И., Пьянкова О.Г., Суслопаров И.М., Мальцев С.В., Таранов О.С., Рыжиков А.Б. Разработка лабораторной установки для изучения трансмиссивности вируса гриппа с пандемическим потенциалом // III Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio-2016» : сборник

- тезисов (Кольцово, 5–6 октября 2016 г.). – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2016. – С.144–148.
3. **Marchenko V.**, Susloparov I., Kolosova N., Goncharova N., Shipovalov A., Ryzhikov A. Highly pathogenic avian influenza virus in Russia, 2014–2015 // IX International Conference «Options IX for the Control of Influenza» (Chicago, USA, 24–28 August 2016). – Chicago: International Society for Influenza and Other Respiratory Virus Diseases, 2016. – P. 297.
 4. Евсеенко В.А., **Марченко В.Ю.**, Суслопаров И.М., Колосова Н.П., Гончарова Н.И., Гудымо А.С., Михеев В.Н., Максютов Р.А., Рыжиков А.Б. Вспышка вируса гриппа птиц H5N8 в Воронежском зоопарке // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных : сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Ставрополь, 5–6 апреля 2017 г.). – Ставрополь, 2017. – С. 25–26.
 5. **Марченко В.Ю.**, Суслопаров И.М., Гончарова Н.И., Святченко С.В., Колосова Н.П., Евсеенко В.А., Гудымо А.С., Михеев В.Н., Максютов Р.А., Рыжиков А.Б. Молекулярно-генетический и вирусологический анализ штаммов вируса гриппа H5N8, выделенных во время вспышек в России в 2016 г. // Молекулярная диагностика – 2017 : сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, 18–20 апреля 2017 г.). – Т. 1. – Тамбов: Юлис, 2017. – С. 221–222.
 6. **Марченко В.Ю.**, Суслопаров И.М., Гончарова Н.И., Святченко С.В., Колосова Н.П., Евсеенко В.А., Гудымо А.С., Михеев В.Н., Максютов Р.А., Рыжиков А.Б. Распространение высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N8-субтипа в России в 2016 г. // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных : сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Ставрополь, 5–6 апреля 2017 г.). – Ставрополь, 2017. – С. 49–51.
 7. **Marchenko V.**, Susloparov I., Kolosova N., Goncharova N., Komissarov A., Fadeev A., Gudymo A., Danilchenko N., Piankova O., Maltsev S., Svyatchenko S., Durymanov A., Ilyicheva T., Mikheev V., Maksyutov R., Ryzhikov A. Influenza virus surveillance at the human-animal interface and characterization of avian influenza viruses A(H5N8) isolated in Russia in 2016–2017 years // Trends in Influenza Research: Abstract book of International conference (Saint-Petersburg, 18–20 September 2017). – СПб.: Институт гриппа, 2017. – P. 42–43.
 8. **Марченко В.Ю.**, Колосова Н.П., Гончарова Н.И., Суслопаров И.М., Гудымо А.С., Святченко С.В., Гаврилова Е.В., Максютов Р.А., Рыжиков А.Б. Выделение и характеристика высокопатогенных вирусов гриппа H5NX, выделенных в России // V Международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов

- «ОренBio-2018»: сборник тезисов. – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2018. – С. 187–189.
9. **Марченко В.Ю.**, Колосова Н.П., Гончарова Н.И., Суслопаров И.М., Гудымо А.С., Святченко С.В., Гаврилова Е.В., Максютов Р.А., Рыжиков А.Б. Сравнительный молекулярно-генетический и вирусологический анализ высокопатогенных вирусов гриппа H5NX, выделенных в России в 2016–2017 г. // Молекулярная диагностика – 2018 : материалы Международной научно-практической конференции (Минск, Беларусь, 27–28 сентября 2018 г.). – Минск, 2018. – С. 512–513.
 10. Акимова А.С., **Марченко В.Ю.** Выявление антител к высокопатогенным вариантам вируса гриппа птиц в сыворотках крови людей, контактировавших с дикой и домашней птицей // Проблемы биологии, зоотехнии и биотехнологии : сборник трудов научно-практической конференции научного общества студентов и аспирантов биолого-технологического факультета. (Новосибирск, 10–14 декабря 2018 г.). – Новосибирск: Золотой колос, 2019. – С. 124–129.
 11. **Марченко В.Ю.**, Гудымо А.С., Гончарова Н.И., Святченко С.В., Евсеенко В.А., Колосова Н.П., Суслопаров И.М., Гаврилова Е.В., Максютов Р.А., Рыжиков А.Б. Мониторинг вируса гриппа птиц на территории Российской Федерации (2013–2018 гг.) // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных : сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Ставрополь, 24–25 апреля 2019 г.). – Ставрополь, 2019. – С. 47–49.
 12. **Marchenko V.**, Goncharova N., Gudymo A., Svyatchenko S., Susloparov I., Kolosova N., Gavrilova E., Maksyutov R., Ryzhikov A. Highly pathogenic avian influenza virus in Russia, 2016–2018 // X International Conference «Options X for the Control of Influenza» (Singapore, 28 August – 1 September 2019). – Singapore: International Society for Influenza and Other Respiratory Virus Diseases, 2019. – P. 478.