

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»

На правах рукописи

Гусева Нелли Андреевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА
БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2019-2023 ГГ**

1.5.10 «Вирусология»

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат ветеринарных наук
Чвала Илья Александрович

Владимир – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Характеристика вируса ньюкаслской болезни.....	11
1.1.1. Таксономическое положение вируса ньюкаслской болезни.....	11
1.1.2. Структура вириона и вирусные белки.....	11
1.1.3. Проникновение вируса в клетку и цикл репликации.....	16
1.2. Факторы вирулентности вируса ньюкаслской болезни.....	17
1.2.1. Определение вирулентности изолятов вируса ньюкаслской болезни.....	18
1.2.2. Основные детерминанты вирулентности вируса ньюкаслской болезни.....	18
1.3. Восприимчивые животные.....	19
1.4. Механизмы передачи вируса ньюкаслской болезни.....	21
1.5. Генетическое разнообразие штаммов и изолятов вируса ньюкаслской болезни.....	22
1.5.1. Системы классификации вируса ньюкаслской болезни.....	22
1.5.2. Распространение различных генетических групп вируса ньюкаслской болезни в мире.....	25
1.6. Эпизоотический процесс в мире.....	28
1.6.1. Эпизоотический процесс в Российской Федерации.....	31
1.7. Заключение по обзору литературы.....	33
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1. Материалы и методы.....	35
3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	49
3.1. Анализ свойств изолятов вируса ньюкаслской болезни, выявленных на территории РФ в 2019-2023 гг.....	49
3.2. Выделение вируса на СПФ-КЭ.....	59

3.3. Определение полных нуклеотидных последовательностей генов F и HN и нуклеотидных последовательностей полных геномов изолятов вируса ньюкаслской болезни субгенотипа VII.1.1, выявленных в регионах РФ в 2019-2023 гг.....	63
3.4. Филогенетический анализ изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1, выявленных в РФ в 2019-2023 гг.....	67
3.5. Эволюционный анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей изолятов ВНБ, выявленных в РФ в 2019-2023 гг...	70
3.6. Разработка метода ОТ-ПЦР-РВ для выявления РНК вируса ньюкаслской болезни генотипа VII и его производных.....	72
3.7. Разработка метода определения первичной структуры генов F и HN изолятов вируса ньюкаслской болезни генотипа VI с помощью ОТ- ПЦР и нуклеотидного секвенирования.....	78
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
4.1. Выводы.....	84
4.2. Практические предложения.....	85
4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы.....	86
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	87
6. ПРИЛОЖЕНИЯ.....	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Ньюкаслская болезнь (НБ) ежегодно регистрируется во всем мире у домашних птиц, в том числе у кур, гусей, уток, индеек и т.д. Заболевание наносит большой ущерб промышленному и домашнему птицеводству во всем мире и внесено в список нотифицируемых заболеваний Всемирной организации здоровья животных (ВОЗЖ) [175]. НБ вызывают велогенные штаммы *Avian paramyxovirus 1*, прежнее название *Avian orthoavulavirus 1*. *Avian paramyxovirus 1* (APMV1) относится к семейству *Paramyxoviridae* подсемейству *Avulavirinae* роду *Orthoavulavirus* виду *Orthoavulavirus javaense* и обладает высоким генетическим разнообразием штаммов и изолятов [69]. В настоящее время все штаммы и изоляты APMV1 делят на два класса – класс I и класс II. Класс I включает в себя единственный генотип 1, который подразделяется на субгенотипы 1.1.1, 1.1.2 и 1.2. Класс II состоит по крайней мере из 20 различных генотипов, часть из которых делятся на субгенотипы [168].

Геном APMV1 представляет собой одноцепочечную молекулу (-) РНК длиной около 15 тыс. нуклеотидов, кодирующую шесть структурных белков – нуклеопротеин (NP), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), белок слияния (F), гемагглютинин-нейраминидазу (HN) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L). Основной детерминантой вирулентности изолятов APMV1 является аминокислотный состав сайта расщепления белка слияния F. Вирулентные изоляты характеризуются наличием нескольких (трех и более) основных аминокислот на С-конце белка F2 в позициях 113-116 и фенилаланина на N-конце белка F1 в позиции 117 сайта протеолитического расщепления белка слияния – 112-R/G/K R Q/K K/R R^ΔF-117. Авирулентные изоляты содержат в сайте расщепления всего 2 основные аминокислоты и лейцин в положении 117 – 112-G R Q G R^ΔL-117 [91,149,151].

За последние 20 лет наибольшую угрозу для стран Европы, Азии и Африки представляют вспышки НБ, вызванные APMV1 генотипа VII класса II. Наибольшее распространение получили субгенотипы VII.1.1 и VII.2 [172]. Субгенотип VII.1.1 выявляли с конца 1990-х годов в Китае [35,66], Иране [37,154], Тайване [133],

Афганистане [83], Саудовской Аравии [26], Ираке [81], Египте [21,68,108,157], Индонезии [140], а также Японии [96] и Вьетнаме [28,109]. Субгенотип VII.2 изначально выявляли в странах Юго-Восточной Азии (Камбоджа, Индонезия, Малайзия) в 2007-2014 гг. [126,155], откуда он распространился в Мозамбик [134], Ботсвану [60] и Танзанию [107], а также в страны Европы и Азии: Израиль, Иорданию [141], Китай [35], Пакистан [82], Оман [84], Индию [20], Болгарию, Грузию и Бельгию [28,103].

На территории России в разные периоды времени выявляли вирусы ньюкальской болезни (ВНБ) субгенотипов VII.1.1 (2000-2010 гг) [10,16] и VII.2 (2013 г., 2016-2017 гг.) [5,15].

С 2019 года все вспышки НБ на территории Российской Федерации (РФ) были вызваны вирусами субгенотипа VII.1.1 (субгенотипа VII-L, по классификации Diel et al. 2012 г [62], предложенного Esmaelizad M. et al. [80]). Первые данные о вирусах субгенотипа VII-L были представлены исследователями из Ирана в 2017 году [116]. В своем исследовании авторы [97,154] указали на сходство и филогенетическую близость с вирусами субгенотипа VII-d. В следующих исследованиях те же авторы [37,116,146] показали распространение вирусов субгенотипа VII-L практически по всем провинциям Ирана. Эти данные свидетельствуют о высоком панзоотическом потенциале вирусов данной группы, которые также могут представлять угрозу для домашнего и промышленного птицеводства на территории РФ и сопредельных государств.

Степень разработанности проблемы. Широкое разнообразие штаммов и изолятов ARMV1 объясняет важность изучения молекулярно-генетических свойств вновь выявленных вирусов, в первую очередь для определения их вирулентности. Основной молекулярной детерминантой вирулентности изолятов ВНБ является аминокислотный состав сайта расщепления белка слияния F. Расщепление белка слияния на субъединицы F1 и F2 необходимо для инфекционного процесса, что было подтверждено многими исследователями [44,58,112,114,147].

Определение нуклеотидной последовательности гена слияния F лежит в основе большинства научных исследований, связанных с АPMV1. Так, ряд исследователей изучали эволюционную динамику, молекулярную эпидемиологию и генетическое разнообразие АPMV1, основываясь на полных или частичных последовательностях гена слияния F [61,70,102,163].

В исследованиях отечественных ученых также большое внимание уделяется молекулярно-генетическим свойствам изолятов ВНБ. В работах Пчелкиной И.П., Колосова С.Н., Коротецкого И.С., Богоявленского А.П., Ртищева А.А., Глущенко А.В. и др. представлены исследования генетического разнообразия и некоторых биологических свойств выявленных вирусов [1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 29, 33, 39, 46, 47, 117].

Также, в 2012 г. группой исследователей была предложена унифицированная и объективная система классификации ВНБ, основанная на полной нуклеотидной последовательности гена слияния F (Diel et al., 2012) [62]. В 2019 году для повышения надежности определения принадлежности выявленных вирусов к той или иной генетической группе данная классификация была доработана и усовершенствована экспертной группой ученых из разных стран мира [168].

Цель и задачи исследования. Цель работы – изучить молекулярно-генетические свойства изолятов вируса ньюкаслской болезни, выявленных на территории Российской Федерации в 2019-2023 гг.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Определить основные генетические группы АPMV1, циркулирующего на территории РФ в 2019-2023 гг.;
- Определить полные нуклеотидные последовательности генов F и HN, а также нуклеотидные последовательности полных геномов ряда изолятов ВНБ, выявленных в разных регионах страны в 2019-2023 гг.;
- Провести филогенетический и эволюционный анализ варибельности нуклеотидных последовательностей изолятов ВНБ, выявленных в 2019-2023 гг.;

- Разработать методические рекомендации по выявлению РНК АРМV1 генотипа VII с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени в пробах биологического материала птиц;
- Разработать методические рекомендации по определению первичной структуры генов F и HN изолятов вируса болезни Ньюкасла генотипа VI с помощью ОТ-ПЦР и секвенирования;
- Провести депонирование во Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» выделенных изолятов ВНБ, выявленных в разных регионах РФ, как стандартных образцов для лабораторной диагностики.

Научная новизна работы. В результате проведенных исследований определены основные генетические группы изолятов ВНБ, циркулирующих на территории РФ: вирулентные вирусы генотипа VII, выявляемые у домашних птиц в личных подсобных хозяйствах (ЛПХ) граждан; вирулентные изоляты генотипа VI и его производных, циркулирующие в популяциях голубей; авирулентные вирусы генотипа I класса II, выявляемые в основном у диких водоплавающих птиц; лентогенные и реже мезогенные вакцинные штаммы генотипов I, II и III.

Изучены молекулярно-генетические свойства 40 изолятов вируса ньюкаслской болезни субгенотипа VII.1.1 (VII-L). В ходе проведения филогенетического и эволюционного анализа вариабельности нуклеотидных последовательностей было установлено, что российские изоляты представляют собой монофилетическую группу в рамках субгенотипа VII-L, что указывает на их происхождение от возможно единственного заноса одного из представителей субгенотипа на территорию страны.

Теоретическая и практическая значимость проведенных исследований. Полученные штаммы ВНБ могут быть использованы в качестве стандартных образцов при разработке и совершенствовании средств и методов лабораторной диагностики, а также при контроле ветеринарных препаратов. Получен патент на

«Штамм «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни птиц для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц. В ходе выполнения научно-исследовательских работ по теме диссертации были разработаны, одобрены и утверждены Ученым советом ФГБУ «ВНИИЗЖ» следующие методики:

«Методические рекомендации по выявлению РНК изолятов *Avian orthoavulavirus 1* генотипа VII и его производных с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени» (Приложение 1);

«Методические рекомендации по определению первичной структуры генов F и HN изолятов вируса ньюкаслской болезни генотипа VI с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования» (Приложение 2);

«Методические рекомендации по определению последовательности ДНК с помощью реакции секвенирования на генетическом анализаторе НАНОФОР-05» (Приложение 3).

Проведено депонирование девяти штаммов ВНБ субгенотипа VII.1.1 (VII-L) и одного штамма субгенотипа XXI.1.1 (VI-g) во Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ»: «NDV/chicken/Rus/Primorsk/5636/19» (рег. № 298 – деп / 20-86), «NDV/poultry /Rus/Kursk/5497/19» (рег. № 297 – деп / 20-85), «NDV/chicken/Rus/Stavropol/509/19» (рег. № 296 – деп / 20-84), «NDV/chicken/Rus/Vladimir/985/20» (рег. № 346 – деп / 21-7), «NDV/chicken/Rus/Khanty-Mansi/1240-1/21» (рег. № 375 – деп / 22-9), «NDV/chicken/Rus/Ingushetia/1750/20» (рег. № 495 – деп / 23-45), «NDV/chicken/Rus/N.Novgorod/667/21» (рег. № 500 – деп / 23-50), «NDV/chicken/Rus/Bashkortostan/2776/22» (рег. № 493 – деп / 23-43), «NDV/quail/Rus/Mari El/128/23» (рег. № 558 деп/25-36) и 1 изолята субгенотипа XXI.1.1 (VI-g) – «NDV/pigeon/Rus/Tatarstan/311/20» (рег. № 494 – деп / 23-44) (Приложение 4 - 13).

Методы исследования. Методология проведенных исследований включает стандартные процедуры с использованием различных материалов. В работе использовали молекулярно-биологические, вирусологические и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на публичное представление.

1. Результаты исследования проб биологического материала от птиц, отобранных с целью выявления РНК АРМV1 на территории РФ в 2019-2023 гг.;
2. Филогенетический анализ и молекулярно-генетические свойства изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1, выявленных в регионах РФ в 2019-2023 гг.;
3. Эволюционный анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1, выявленных в регионах РФ в 2019-2023 гг.

Степень достоверности и апробации результатов.

Результаты проведенных исследований получены с использованием стандартных методик и большого объема экспериментального материала. Степень достоверности результатов экспериментов подтверждена обработкой их статистическими методами и комиссионными испытаниями. Полученные результаты доложены в работе: X международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика» (Москва, 2021 г.); VI Международной научной конференции «Достижения ученых – в ветеринарную практику» (Владимир, 2022 г.); научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых «Молодые ученые – науке и практике АПК» (Витебск, 2023 г.) и на заседаниях Ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» (2020-2023 гг.).

Основные результаты диссертационных исследований опубликованы в восьми научных работах, из них три статьи в рецензируемых изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, две публикации в международных журналах, цитируемых в системах Web of

Science и Scopus. По результатам научных исследований получен патент на изобретение № 2821028 «Штамм “ВНИИЗЖ G7” вируса ньюкаслской болезни птиц для изготовления бипрепаратов для диагностики и специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц» (Приложение 14).

Личный вклад автора. Основной объем проведённых исследований и анализ полученных результатов выполнены автором самостоятельно. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю кандидату ветеринарных наук Чвала И.А. и сотрудникам ФГБУ «ВНИИЗЖ»: кандидатам наук С.Н. Колосову, А.А. Козлову, Н.Г. Зинякову, А.В. Андриясову, Е.В. Овчинниковой, З.Б. Никоновой, Л.О. Щербаковой, Сосипаторовой В.Ю. за помощь в проведении отдельных этапов работы; д-ру биол. наук Н.С. Мудрак и канд. биол. наук Д.Б. Андрейчуку за консультативную помощь и содействие в выполнении отдельных этапов работы, а также сотрудникам ИАЦ Управления ветнадзора ФГБУ «ВНИИЗЖ».

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика вируса ньюкаслской болезни

1.1.1 Таксономическое положение вируса ньюкаслской болезни

Вирус ньюкаслской болезни или парамиксовирус птиц 1 (*Avian paramyxovirus 1*) относится к семейству *Paramyxoviridae* подсемейству *Avulavirinae* роду *Orthoavulavirus* виду *Orthoavulavirus japonense* [69].

1.1.2 Структура вириона и вирусные белки

Вирионы ВНБ имеют сферическую или эллипсоидную форму. При исследовании вирусных частиц методами электронной микроскопии, было выявлено, что их диаметр сильно варьирует – от 100 до 250 нм [49].

Геном ВНБ представлен одноцепочечной не фрагментированной РНК отрицательной полярности длиной 15186, 15192 или 15198 нуклеотидов. Геном вируса кодирует шесть структурных белков – нуклеопротеин (NP), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), белок слияния (F), гемагглютинин-нейраминидазу (HN) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L) и два неструктурных белка – V и W [121].

Белки F и HN являются гликопротеиновыми комплексами, которые отвечают за связывание с рецепторами клеток и проникновение вируса посредством слияния вирусной оболочки с мембранами клеток-мишеней. Нуклеопротеин (NP) связывается с геномной РНК, что приводит к образованию спирального рибонуклеопротеинового (РНП) комплекса, который служит матрицей для вирусного РНК-зависимого РНК-полимеразного комплекса, состоящего из фосфопротеина (P) и РНК-зависимой РНК-полимеразы (L). Матричный (M) белок обеспечивает сборку вирусных частиц посредством взаимодействия как с нуклеопротеином в комплексе РНП, так и с комплексами гликопротеинов (белки F и HN), которые встроены в мембрану [49, 150].

Белок слияния F представляет собой трансмембранный белок класса I, который синтезируется как неактивный белок-предшественник F0, и состоит из 553

аминокислот [164]. В процессе репликации вируса белок F0 подвергается необратимому конформационному изменению, что способствует слиянию вирусной и клеточной оболочек, открывая пору для доставки вирусного генома в цитоплазму клетки [161]. Расщепление белка-предшественника F0 на дисульфидсвязанные субъединицы F1 и F2 клеточными протеазами необходимо для инфекционного процесса [63].

Для мезогенных и велогенных вирусов характерен многоосновный аминокислотный мотив сайта расщепления белка F (в позициях 112-(K/R)-R-(Q/K)-(R/K)-R-116) на С-конце субъединицы F2, а также фенилаланин на N-конце субъединицы F1 (позиция 117). Данный мотив сайта обеспечивает расщепление белка фуриноподобными протеазами, которые обнаруживают в широком спектре клеток и тканей, что может привести к системной инфекции.

Напротив, белок F лентогенных вирусов содержит лейцин на N-конце субъединицы F1 (позиция 117) и одноосновный аминокислотный мотив на С-конце субъединицы F2 (в позициях 112-(G/E)-(K/R)-Q-(G/E)-R-116). Таким образом, расщепление белка может произойти только под действием трипсиноподобных ферментов, встречающихся в дыхательном и кишечном трактах, что ограничивает репликацию вируса [92].

Белок HN (гемагглютинин-нейраминидаза) представляет собой трансмембранный гликопротеин, расположенный на оболочке вирионов ВНБ. Длина нуклеотидной последовательности гена HN может варьироваться у разных генотипов, что приводит к различной длине белка. Белок HN первоначально продуцируется в виде белка-предшественника HN0, который затем преобразуется в биологически активный гликопротеин HN путем протеолитического удаления небольшого гликозилированного фрагмента. Большинство штаммов ВНБ содержат белки HN состоящие из 577 или 571 аминокислоты. В то же время для велогенных штаммов более характерен белок HN содержащий 571 аминокислоту. Удлинение карбоксильного конца белка HN у авирулентных штаммов является структурной особенностью, которая ухудшает функциональность его предшественника [42].

Белок HN играет множество ролей в процессе заражения:

- опосредует прикрепление вируса к рецепторам, содержащим сиаловую кислоту, на поверхности клетки;
- функционирует как нейраминидаза, удаляя молекулы сиаловой кислоты из вирионов потомства, чтобы предотвратить самоагрегацию во время почкования;
- способствует активности слияния белка F, который отвечает за слияние мембран между оболочкой вируса и клеточной мембраной. Белок HN необходим для эффективного процесса слияния.

Были предложены две модели роли белка HN в процессе слияния вируса с клеткой. Одна из них предполагает, что белки HN и F взаимодействуют только после связывания с рецептором белка HN, инициируя конформационные изменения в белке F, необходимые для слияния. Альтернативная модель предполагает, что белки HN и F образуют метастабильный комплекс перед присоединением белка HN к клетке-хозяину. Последующее присоединение белка HN с сопутствующим изменением конформации высвобождает белок F и стимулирует каскад конформационных изменений белка, необходимых для слияния [170].

Белок HN также функционирует как фактор, определяющий вирулентность и диапазон хозяев для ВНБ [59].

Замена белка HN для штамма с низкой вирулентностью на белок вирулентного штамма позволяет химерному вирусу достигать системных участков, в то время как родительский вирус с низкой вирулентностью реплицируется только локально в дыхательных путях [98, 124].

Белок NP (нуклеопротеин) является РНК-связывающим белком, состоящим из 489 аминокислот. Основной функцией нуклеопротеина является инкапсуляция генома вируса для его транскрипции, репликации и упаковки. Нуклеопротеин инкапсулирует вирусную РНК за счет взаимодействия белков NP между собой и с РНК. В результате этих взаимодействий образуется левосторонняя спиральная сердцевина, которая поддерживается за счет гидрофобных связей. Нуклеопротеин также взаимодействует с белками Р и L и вместе они образуют

рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП), который выступает как матрица для синтеза вирусной РНК. Кроме того стоит отметить, что нуклеотидная последовательность гена NP высококонсервативна среди ВНБ разных генотипов, что используется для разработки средств диагностики ньюкаслской болезни. Белок NP состоит из двух доменов: высококонсервативная и структурированная N-концевая область (ядро) и внутренняя неупорядоченная мономерная C-концевая область (хвост). N-концевая область (ядро) отвечает за связывание белков между собой и с РНК. C-концевой хвост несет участки, необходимые для взаимодействия комплекса NP-РНК с белком Р, тем самым позиционируя полимеразу на матричном РНП комплексе [159].

Белок Р (фосфопротеин) состоит из 395 аминокислот с расчетной молекулярной массой приблизительно 42 кДа. Однако, согласно анализу SDS-PAGE, белок Р обладает относительной подвижностью молекулярных масс (от 53 кДа до 56 кДа). Кислотный N-концевой домен фосфопротеина может объяснять расхождение в молекулярной массе. Транскрипционная модификация мРНК гена Р допускает потенциальную экспрессию двух меньших предполагаемых белков — V и W. Экспрессия этих белков может быть результатом заикания полимеразы в последовательности сайта редактирования. Группа мРНК гена Р управляет трансляцией трех отдельных белков. Проскальзывание AUG-кодона и котранскрипционное редактирование мРНК являются предполагаемыми механизмами экспрессии множества белков из гена Р.

Фосфопротеин парамиксовирусов играет важную роль в репликации и транскрипции генома. Так, комплекс состоящий из белков Р и L служит полимеразой для парамиксовирусов, а белок нуклеопротеина, связанный с белком Р, является необходимым фактором для инкапсуляции недавно синтезированной вирусной геномной РНК. Фосфопротеиновые комплексы с белками NP, L и РНК образуют минимальную транскрипционную единицу парамиксовирусов [127].

Как уже упоминалось ранее, ген Р, помимо белка фосфопротеина, кодирует еще 2 **неструктурных белка** — V и W.

Белок V является неферментативной субъединицей РНК-полимеразы парамиксовирусов и действует как шаперон для белка NP, чтобы предотвратить неконтролируемую инкапсидацию невирусной РНК. Белок V также характеризуется богатым цистеином С-концевым участком, который позволяет связывать ионы цинка и способен противодействовать клеточному интерферонному ответу, что объясняет его роль в вирулентности ВНБ.

Недавние исследования показали, что избыточная экспрессия **белка W** в процессе инфекции ВНБ приводит к изменению нормальной морфологии клетки-хозяина и к её дальнейшей гибели. Было установлено, что белки W способны локализоваться в митохондриях и ядре клетки-хозяина, и оказывать влияние на репликацию ВНБ и на выработку интерферона организмом хозяина [99,173].

Белок M (матричный белок) представляет собой негликозилированный структурный белок, который формирует внутреннюю поверхность вирусной оболочки и является одним из наиболее распространенных белков в вирионах. Открытая рамка считывания гена M различных штаммов ВНБ имеет длину 1095 нуклеотидов и кодирует 364 аминокислоты с молекулярной массой около 40 кДа. Было обнаружено, что белок M является белком ядерно-цитоплазматического транспорта при инфекции ВНБ. Эта особенность обеспечивает ингибицию транскрипции клетки-хозяина, а также помогает регулировать синтез и транскрипцию вирусной РНК. Кроме того, являясь важным структурным белком в морфогенезе вирионов, M-белок участвует в процессах, которые играют жизненно важную роль в репликации и патогенности ВНБ, а именно в синтезе вирусных белков, уклонении от защитных механизмов организма-хозяина, почковании и высвобождении вируса [111].

Белок L (РНК-зависимая РНК-полимераза) состоит из 2204 аминокислот с молекулярной массой около 250 кДа [113]. Как его транскрипционная, так и репликативная активность критически зависят от присутствия белка Р, в комплексе с которым происходит синтез РНК. Во время репликации вируса образуется копия РНК (кРНК), которая служит матрицей для синтеза полноразмерной вирусной

геномной РНК (вРНК). Во время вирусной транскрипции и репликации вРНК связывается с NP-белками с образованием РНП-комплекса. В этих процессах белок Р играет решающую роль в качестве структурного моста, соединяющего белки L и NP. N-конец белка Р образует комплексы с возникающим мономером NP-белка (N0), чтобы предотвратить его случайное инкапсидирование неспецифической РНК [53, 129]. Центральная область белка Р стабилизирует L-белок в комплексе L-Р и необходима для соединения L-белка и матрицы вирусной РНК [160].

1.1.3 Проникновение вируса в клетку и цикл репликации

ВНБ поражает ткани организма-хозяина, связываясь с клеточными рецепторами, содержащими сиаловую кислоту, такими как ганглиозиды и рецепторы N-гликопротеинов. Инфицирование ВНБ происходит независимо от уровня pH среды. Заражение может происходить посредством эндоцитоза, опосредованного рецепторами или посредством эндоцитоза, зависящего от кавеол. После проникновения в цитоплазму клетки-хозяина геном вируса – РНК с отрицательной полярностью транскрибируется в мРНК с положительной полярностью, которая затем транслируется в вирусные белки. Транскрипция начинается с крайней 3'-лидерной последовательности и синтезирует мРНК отдельных генов. Белки NP, Р и L необходимы для сборки нуклеокапсида. РНК с положительной полярностью затем используется в качестве матрицы для синтеза геномной РНК с отрицательной полярностью. Сборка и отпочкование зрелых вирионов зависит от М-белка и липидного слоя на клеточной мембране (Рис. 1) [121].

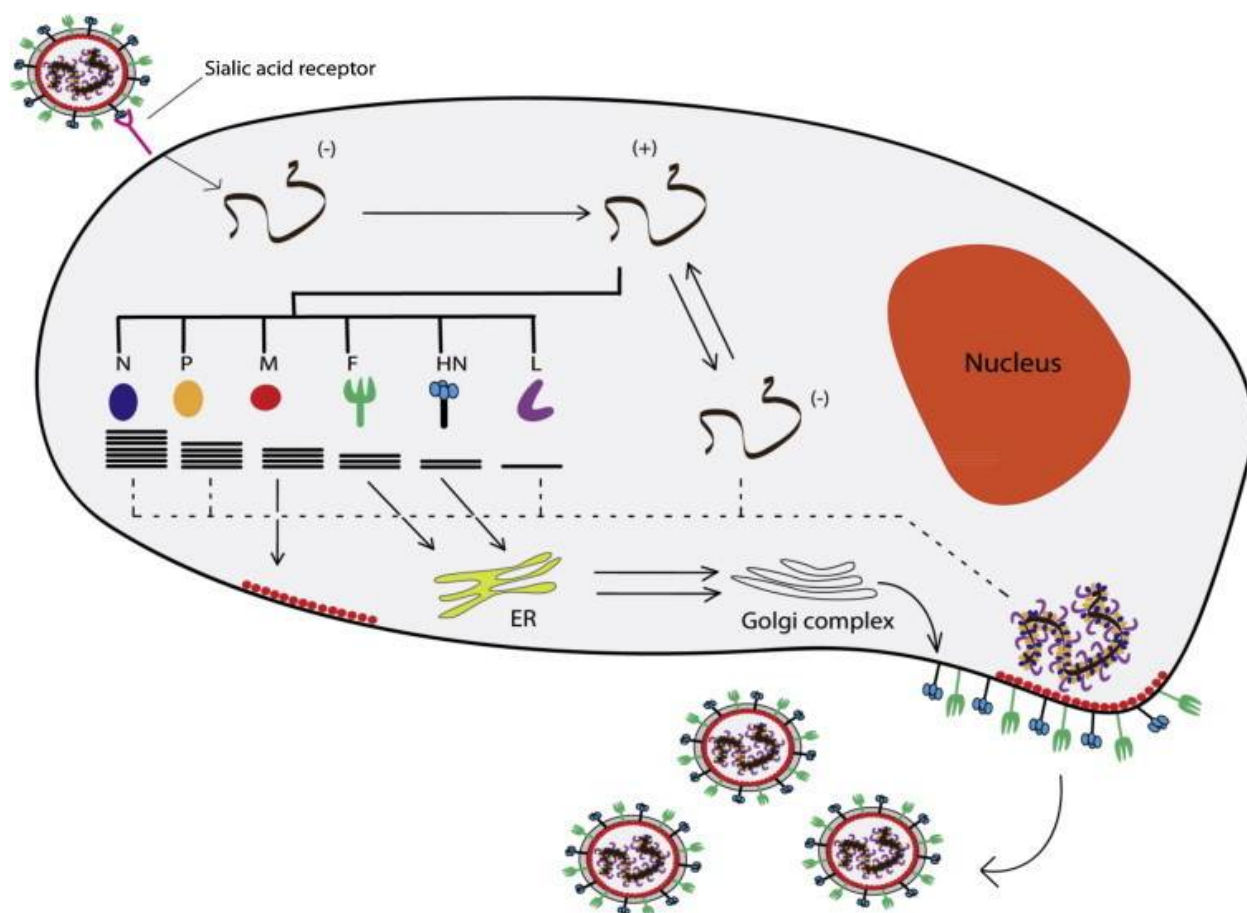


Рисунок 1. Схематическое представление репликации вируса ньюкаслской болезни [160]

1.2 Факторы вирулентности вируса ньюкаслской болезни

ВНБ отличается высоким генетическим разнообразием штаммов и изолятов, которые способны поражать разные системы органов у инфицированных птиц, вызывая симптомы различной степени тяжести. В зависимости от проявления клинических признаков у кур, ВНБ был разделен на три патотипа: лентогенный, мезогенный и велогенный [75].

Лентогенные штаммы ВНБ вызывают легкую субклиническую инфекцию с поражением органов дыхательной системы и желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и считаются низковирулентными. Мезогенные штаммы ВНБ обладают промежуточной вирулентностью, вызывая респираторную инфекцию с небольшой смертностью (менее 10%), в то время как велогенные штаммы обладают высокой вирулентностью, вызывая смертность до 100%. Велогенные штаммы также подразделяются на висцеротропные и нейротропные штаммы. Висцеротропные

велогенные штаммы вызывают летальные геморрагические поражения внутренних органов, тогда как нейротропные велогенные штаммы вызывают неврологические и респираторные расстройства [171].

1.2.1 Определение вирулентности изолятов вируса ньюкаслской болезни

В настоящее время для оценки вирулентности штаммов и изолятов ВНБ *in vivo* используют такие методы, как среднее время гибели куриных эмбрионов (КЭ) (MDT) [71], индекс патогенности при внутривенном заражении шестинедельных цыплят (IVPI) [23] и индекс внутримозговой патогенности при заражении однодневных цыплят (ICPI) [174].

Методы MDT и IVPI считаются недостаточно надежными при оценке степени вирулентности штаммов ВНБ, особенно при выделении вируса не от кур [23, 36, 119].

В соответствии с рекомендациями ВОЗЖ, общепринятым методом для определения вирулентности штаммов ВНБ *in vivo* является ICPI [174]. Для высоковирулентных штаммов ВНБ характерны значения близкие к максимальному баллу – 2.0, тогда как для авирулентных штаммы характерны значения близкие к 0.

Последние исследования молекулярных основ патогенности ВНБ позволяют определить вирулентность вируса (но не её отсутствие) с помощью тестов *in vitro*, в ходе которых определяют аминокислотную последовательность сайта расщепления белка F0.

Таким образом, штамм или изолят ВНБ считается вирулентным при значении ICPI 0,7 или выше или при наличии нескольких (трех и более) основных аминокислот в позициях 112-116 и фенилаланина в позиции 117 сайта протеолитического расщепления белка слияния F0 [27, 171, 174].

1.2.2 Основные детерминанты вирулентности вируса ньюкаслской болезни

Проникновение многих оболочечных вирусов, в том числе ВНБ, в клетки-хозяева часто требует активации вирусных гликопротеинов путем расщепления

внутриклеточными или внеклеточными протеазами [88]. Впервые исследование вирулентности штаммов и изолятов ВНБ проводили с помощью воздействия различных мутагенов на вирусы с целью обнаружения различий в функциональности определенных белков. В результате мутанты приобретали или утрачивали способность образовывать бляшки в культуре клеток и давали низкие значения при определении среднего времени гибели на КЭ [95, 112]. Обширные исследования *in vitro* Nagai и соавторов [114, 115] показали, что у всех изученных штаммов ВНБ вирулентность коррелировала с мотивом сайта расщепления белка слияния F. Расщепление предшественника гликопротеина F0 на субъединицы F1 и F2 протеазами клетки-хозяина необходимо для инфекционного процесса [44, 58, 147, 153]. Лентогенные вирусы как правило имеют одноосновной аминокислотный мотив в сайте расщепления белка слияния F – 112G-R / K-Q-G-R↓L117 и лейцин в положении 117, и расщепляются внеклеточно трипсиноподобными протеазами, которые обнаружены в большом количестве в дыхательном и кишечном тракте. Мезогенные и велогенные штаммы имеют многоосновной аминокислотный мотив – 112R/G/K-R-Q/K-K/R-R↓F117 и фенилаланин в позиции 117 и могут расщепляться внутриклеточно фуриноподобными протеазами [58, 115, 147]. Это приводит к системной инфекции, при которой смертность среди птиц может достигать 100%.

Таким образом, можно сделать вывод, что аминокислотная последовательность сайта расщепления белка слияния F является основным фактором, определяющим вирулентность ВНБ [58, 115].

1.3 Восприимчивые животные

По литературным данным восприимчивыми к заражению ВНБ являются 241 вид птиц из 27 разных отрядов. Существует высокая вероятность того, что все виды птиц восприимчивы к инфекции, но исход заражения с точки зрения заболеваемости у разных видов значительно различается и зависит от патотипа вируса [174].

Вирулентные штаммы ВНБ выявляли у всех видов птиц, которых выращивают в промышленных масштабах, в т.ч. от голубей и страусов [17, 22, 24, 131]. Проявление клинических признаков может сильно варьироваться и зависит от вида птицы и патотипа вируса. Так, например, у уток и гусей заболевание может протекать бессимптомно или с легкими клиническими признаками по сравнению с заболеванием у кур. Также, например, наблюдаются трудности в постановке диагноза по клиническим признакам у фазанов и страусов, так как течение болезни может отличаться у молодых и взрослых особей.

Большую роль в распространении ВНБ также играет домашняя птица, выращиваемая в небольших количествах в ЛПХ граждан или небольших фермах. Например, в США в 2002-2003 гг. произошло широкое распространение ньюкаслской болезни на 21 птицефабрику в Южной Калифорнии в результате активной циркуляции вирулентных изолятов среди бойцовых петухов. Вспышки привели к уничтожению 3 миллионов птиц. Наиболее значимыми факторами риска заражения коммерческих стад были контакты работников птицефабрик с зараженной домашней птицей [22].

В литературе также имеется достаточно данных об обнаружении ВНБ у диких птиц. В основном это были сообщения о выявлении вирусов с низкой вирулентностью от диких водоплавающих птиц, но также были сообщения о выявлении высоковирулентных изолятов [22, 33, 43, 47, 108].

Наиболее значительными вспышками НБ среди диких птиц были случаи выявления вируса у бакланов в разных частях мира. Так, широкое распространение ВНБ среди бакланов наблюдалось в 1990-х годах в Северной Америки. Вирусы выделяли от трупов птиц в Канаде и США. Генетический анализ данных вирусов показал их высокое сходство. Более ранние сообщения о НБ у бакланов и родственных им видов поступали в конце 1940-х годов в Шотландии (Blaxland J.D., 1951) и в 1975 году в Квебеке (Kuiken T., 1998). Таким образом, возможно, что бакланы представляют собой один из источников вирулентного ВНБ [30, 57].

В литературе также имеются данные о возникновении вспышек НБ в результате передачи вируса от диких птиц домашним [54].

Например, было проведено исследование в ходе которого выяснилось, что вирус, ответственный за вспышки НБ в Великобритании в 1997 году, скорее всего, был занесен мигрирующими дикими птицами. Также случай передачи вируса от диких птиц домашним был описан в Европе в 1996 году: вирус, выделенный от диких фазанов в Дании, был тесно связан с вирусом, выделенным от гусей в Финляндии, а затем в 2001 году от баклана в Дании [22].

Все выше описанные случаи указывают на значительную роль диких птиц в передачи вирулентных изолятов ВНБ.

1.4 Механизмы передачи вируса ньюкаслской болезни

Заражение ВНБ происходит главным образом при вдыхании или проглатывании инфекционных частиц, а также при контакте со слизистыми оболочками инфицированных птиц. Главным фактором распространения вируса от одной птицы к другой является наличие инфекционного агента в инфекционной форме. Выделение вируса зависит от органов, в которых вирус размножается, что может варьироваться в зависимости от вирусного патотипа.

Птицы с респираторными клиническими признаками, предположительно, выделяют вирус в виде аэрозолей слизи, которые могут вдыхаться восприимчивыми птицами. Вирусы, которые в основном размножаются только в кишечнике, могут передаваться при проглатывании зараженных фекалий, либо непосредственно, либо с зараженной пищей или водой, либо в результате образования мелких инфекционных частиц, образующихся из высушенных фекалий, которые могут вдыхаться или оседать на слизистых оболочках.

Способ передачи вируса, вероятно, зависит от многих факторов окружающей среды, которые могут существенно повлиять на скорость распространения. Вирусы передаются респираторным путем в помещениях где птицы расположены очень тесно друг к другу, например, в бройлерных хозяйствах интенсивного содержания.

Вирусы, выделяющиеся с фекалиями и передаваемые главным образом орально-фекальным путем, могут распространяться чрезвычайно медленно,

особенно если птицы не находятся в непосредственном контакте, например, в многоярусных отдельных клетках.

Вертикальная передача ВНБ в настоящее время недостаточно изучена, особенно в отношении вирулентных вирусов, которые обычно снижают яйценоскость у восприимчивых к заболеванию птиц. Однако, в литературе описано несколько случаев выделения вакцинных и вирулентных вирусов из яиц, отложенных инфицированными птицами [22, 142, 167].

1.5 Генетическое разнообразие штаммов и изолятов вируса ньюкаслской болезни

1.5.1 Системы классификации вируса ньюкаслской болезни

Широкая циркуляция изолятов ВНБ в популяциях птицы привела к значительному генетическому разнообразию и постоянному появлению новых линий вируса. Учитывая клиническую и экономическую значимость ньюкаслской болезни для птицеводства и широкое использование живых вакцин во всем мире, секвенирование и филогенетический анализ стали главными методами лабораторной диагностики для характеристики штаммов ВНБ, циркулирующих в полевых условиях [87]. Для отслеживания эволюции и генетического разнообразия изолятов ВНБ с конца 1980-х годов было разработано несколько систем молекулярной классификации ВНБ [63].

Так, Sakaguchi и Toyoda с соавторами в 1989 году опубликовали два связанных исследования, основанных на анализе разнообразия последовательностей генов слияния (F) и гемагглютинин-нейраминидазы (HN), а также размеров гена HN. В результате было предположено существование трех линий ВНБ, а именно А, В и С [122, 123]. В 1996 году Ballági-Pordani с соавторами была предложена классификация изолятов ВНБ на основе анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. В результате все штаммы и изоляты ВНБ были разделены на шесть различных генотипов (с I по VI) [76]. В дальнейшем, эта система была дополнительно усовершенствована с помощью филогенетического

анализа частичных последовательностей гена слияния F [120, 165]. Последующее исследование, основанное на полных последовательностях генома, выявило существование трех различных размеров генома ВНБ (15186, 15192 и 15198 нуклеотидов), что позволило разделить изоляты ВНБ на два класса – класс I и класс II [164]. Каждый класс был дополнительно разделен на несколько генотипов [31, 102, 125, 139]. В то же время Aldous и коллегами была предложена другая система классификации, основанная на частичном анализе гена слияния F. В рамках этой классификации изоляты ВНБ разделили на 6 отдельных линий и 13 подлиний, а позже была предложена дополнительная линия 7 [18, 55, 126].

Описанные выше системы классификации содержали важную информацию об эволюции и генетическом разнообразии ВНБ. Однако каждая система основывалась на разных подходах и не имела объективных критериев для отнесения изолятов ВНБ к различным генетическим группам.

Для преодоления этой проблемы в 2012 году Diel и соавторами была предложена унифицированная и объективная система классификации ВНБ [62]. Эта система была основана на полной нуклеотидной последовательности генов слияния F, и включала ряд объективных критериев для классификации ВНБ: филогенетическую топологию, межпопуляционные эволюционные расстояния, бутстреп и эпидемиологическую независимость по крайней мере четырех изолятов на субгенотип. В рамках предложенной классификации, изоляты ВНБ класса I были определены в единый генотип (генотип I), содержащий три субгенотипа, в то время как класс II включал вирусы, разделенные на 15 генотипов (с I по XV) с подразделением на множество субгенотипов [19].

Эта система получила широкое распространение, и ее использование привело к обнаружению еще трех генотипов (XVI, XVII и XVIII) [72, 74, 138]. Кроме того, было предложено несколько новых субгенотипов в рамках многих существующих генотипов [66, 73, 89, 120, 130, 137, 154, 163].

Предложенная Diel система классификации определила объективные критерии для классификации ВНБ, но широкая циркуляция и постоянная эволюция изолятов ВНБ привели к почти одновременной идентификации и

нескоординированному присвоению наименований новым генотипам. Также некоторые новые генотипы были предложены без учета всех критериев, или классификация была проведена с использованием ограниченного набора данных последовательностей (часто с использованием частичных последовательностей гена F).

Для устранения возникших трудностей, в 2019 году была создана экспертная группа исследователей из разных стран мира для углубленного анализа генетического разнообразия, а также создания универсальной классификации изолятов и штаммов ВНБ. Вновь предложенная система классификации была основана на критериях классификации Diel с соавторами (2012) и усовершенствована для повышения надежности определения принадлежности выявленных вирусов к той или иной генетической группе [168].

В ходе работы исследователями были предложены следующие критерии классификации изолятов ВНБ:

1. Отнесение вирусов к новым генотипам и субгенотипам осуществляется на основе филогенетического анализа полной нуклеотидной последовательности гена слияния F (длина последовательности не менее 1645 нуклеотидов);

2. Отнесение вирусов к новым генотипам и субгенотипам осуществляется только с использованием полного набора данных последовательностей всех существующих генотипов. Для присвоения наименований новым генотипам и субгенотипам необходимо выполнять все перечисленные ниже критерии классификации;

3. Пилотное филогенетическое древо может использоваться для отнесения новых изолятов к существующим субгенотипам;

4. Новые генотипы или субгенотипы создаются только при наличии четырех или более независимых изолятов, не имеющих прямой эпидемиологической связи (т.е. отдельных вспышек) [62];

5. Новые генотипы и субгенотипы создаются на основе топологии филогенетического дерева (необходимо группировать в монофилетические ветви) с использованием метода максимального правдоподобия и общей обратимой во

времени модели нуклеотидных замен с гамма-распределением с использованием RAxML (A Parallel Program for Phylogenetic Tree Inference) или аналога;

6. Среднее расстояние (эволюционные расстояния) между группами определяется как количество замен оснований на сайт путем усреднения по всем парам последовательностей между группами с использованием программного обеспечения MEGA (или аналога) и с использованием модели максимального составного правдоподобия со скоростью изменения между сайтами, которая была смоделирована с использованием гамма-распределения (параметр формы = 1) [62];

7. У различных генотипов среднее эволюционное расстояние на участок превышает 10% (0,1) [62];

8. У различных субгенотипов среднее эволюционное расстояние на сайт превышает 5% (0,05);

9. Значение начальной загрузки в узле, определяющем генотип и субгенотип, составляет 70% или выше ($\geq 70\%$);

10. Вирусы, которые не соответствуют всем критериям классификации, относятся к субгенотипу более низкого порядка (ближе к корневому) [168].

1.5.2 Распространение различных генетических групп вируса ньюкаслской болезни в мире

По данным ВОЗЖ вспышки НБ в настоящее время регистрируют по всему миру. На конец 2023 года заболевание находилось под контролем в Канаде, Соединенных Штатах Америки и некоторых странах Западной Европы. Регионы мира, в которых в 2019-2023 гг. выявляли ВНБ представлены на карте (рис. 2).

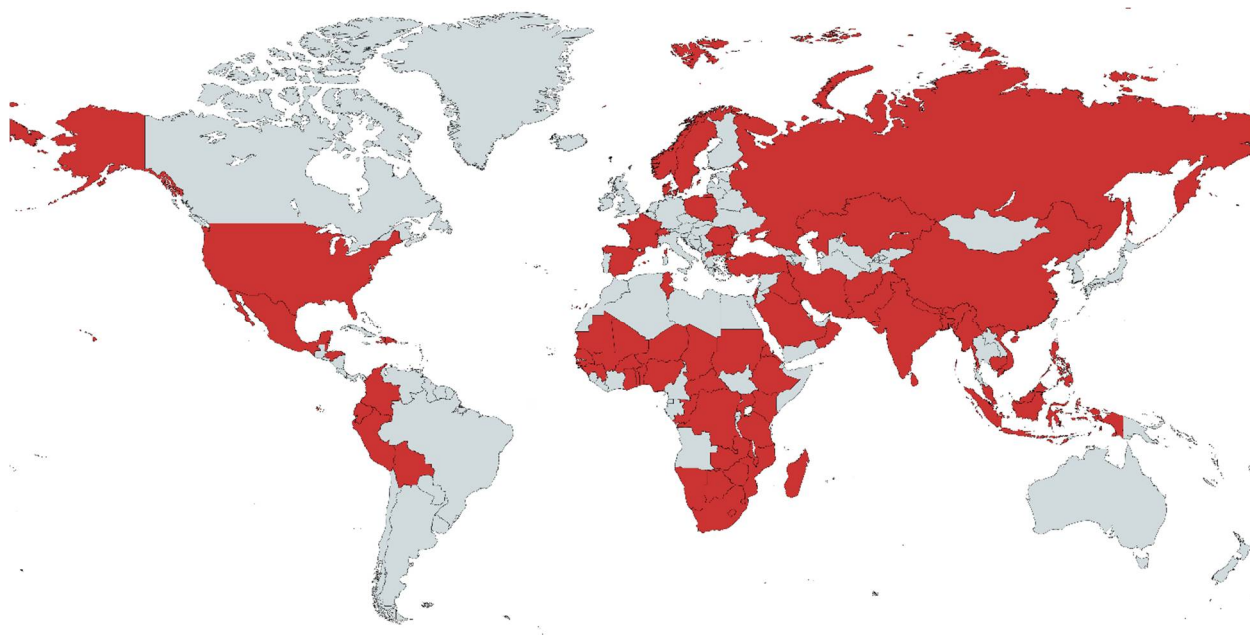


Рисунок 2 - Распространение вируса ньюкаслской болезни в мире (данные за 2019-2023 гг.)

В соответствии с классификацией Димитров и соав. (2019) все штаммы и изоляты ВНБ в настоящее время делят на 2 класса – класс I и класс II. Класс I состоит из единственного генотипа 1, который в свою очередь подразделяется на субгенотипы 1.1.1, 1.1.2 и 1.2. Класс II включает более 20 разных генотипов, часть из которых разделены на субгенотипы.

Вирулентные изоляты ВНБ в 2023 году выявляли в некоторых частях Африки, Европы, Азии и Южной Америки. Так как, есть предположения, что дикие птицы способны переносить вирус, не заболевая, вспышки могут возникать везде, где содержится домашняя птица. Информация о распространении и выявлении изолятов ВНБ различных генотипов представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Распространение изолятов различных генотипов ВНБ в мире

Класс	Генотип	Субгенотип	Распространение	Вирулентность изолятов
I	1	1.1.1 1.1.2 1.2	Страны Европы, Азии, Северной Америки	Авирулентные
II	I	I.1.1 I.1.2.1 I.1.2.2 I.2	Страны Восточной и Западной Африки (Танзания, Нигерия), Южной Америки (Колумбия), Северной Америки (Мексика,	Авирулентные

		США), Азии (Китай, Малайзия, Южная Корея, Япония), Европы (Люксембург, Россия, Украина), Австралия, Мадагаскар	
II	-	Танзания, Северная Америка, а также были идентифицированы в Африке, Азии, Европе и Южной Америке	Авирулентные
III	-	Индия, Юго-Восточная Азия, Австралия, Япония, Китай, Великобритания, Тайвань, Зимбабве, Сингапур, Пакистан	Вирулентные
IV	-	Болгария, Италия, Германия, Индия, Судан, Гонконг, Россия	Вирулентные
V	V.1 V.2	Страны Северной Америки (Мексика, США, Канада), Европы (Болгария, Италия, Босния и Герцеговина, Германия, Хорватия, Словения и Югославия), а также Танзания, Кения, Бразилия, Центральная Америка	Вирулентные
VI	VI.2.1.1.1 VI.2.1.1.1 VI.1.1 VI.1.2.2.2 VI.1.2.2.1 VI.1.2.1.2 VI.2.1.1.2.1 VI.2.1.1.2.2	Страны Африки (Нигерия, Судан, Эфиопия), Европы (Болгария, Испания, Италия, Дания, Швеция, Швейцария, Австрия, Великобритания, Германия, Украина, Россия), Азии (Китай, Япония, Индия, Индонезия, Пакистан, Казахстан, Иран, Бангладеш) также США, Мексика, Бразилия	Вирулентные
VII	VII.1.1 VII.1.2 VII.2	Страны Азии (Китай, Индия, Иран, Пакистан, Тайвань, Афганистан, Оман, Саудовская Аравия, Ирак, Индонезия, Япония, Вьетнам, Камбоджа, Малайзия, Иордания, Казахстан), Африки (Мозамбик, Ботсвана, Танзания, Египет), Европы (Израиль, Болгария, Грузия, Бельгия, Россия)	Вирулентные
VIII	-	Китай, Малайзия, Тайвань, Сингапур, Южная Африка, Аргентина	Вирулентные
IX	-	Китай	Вирулентные
X	-	Аргентина, США	Вирулентные
XI	-	Мадагаскар	Вирулентные
XII	XII.1 XII.2	Китай, Вьетнам, страны Южной Африки (Перу, Колумбия)	Вирулентные

	XIII	XIII.1.1 XIII.1.2 XIII.2.1 XIII.2.2	Иран, Индия, Бангладеш, Казахстан, Пакистан, Швеция, Россия, Танзания, Замбия	Вирулентные
	XIV	XIV.1 XIV.2	Западная и Центральная Африка, Нигерия, Нигер	Вирулентные
	XV	-	Китай	Рекомбинантные штаммы (смешение вирулентных вирусов с вакцинными)
	XVI	-	Доминиканская Республика, Мексика	Вирулентные
	XVII	-	Нигерия, Западная и Центральная Африка	Вирулентные
	XVIII	XVIII.1 XVIII.2	Нигер, Западная и Центральная Африка, Нигерия, Индия, Гана	Вирулентные
	XIX	-	США, Канада	Вирулентные
	XX	-	Испания, Танзания, Восточная Азия	Вирулентные
	XXI	XXI.1.1 XXI.1.2 XXI.2	Россия, Украина, Китай, Бангладеш, Пакистан, Иран, Казахстан, Египет	Вирулентные
	XXII	XXII.1 XXII.2	Индия	Вирулентные

1.6 Эпизоотический процесс в мире

Впервые в мире официальная вспышка НБ была зарегистрирована в 1926 году на о. Ява в Индонезии [52] и на территории Англии [93], затем заболевание охватило всю Центральную Европу [78].

На данный момент в литературе описано несколько панзоотий НБ, вызванных вирусами разных генотипов класса II [156].

Вирусы генотипов II, III и IV были ответственны за **первую панзоотию** в период с 1920-х по 1960-е годы.

Изоляты генотипа II впервые были выявлены в Северной Америке, а затем в Африке, Азии, Европе и Южной Америке, главным образом у кур и домашних водоплавающих птиц [45,72,156]. Некоторые изоляты данного генотипа были определены как вирулентные [45, 156, 158], что показывает их экономическую значимость для птицеводства.

В настоящее время вирусы генотипа II широко используются в качестве живых и инактивированных вакцин против НБ (например, Ла-Сота и B1). Первые сообщения о выявлении вирусов генотипа III были получены из Австралии в 1932 году и Японии в 1930-1960 гг. [76, 120]. Также представителей этой генетической группы спорадически выявляли в Великобритании, Тайване, Зимбабве и Сингапуре в 1960-х и начале 1990-х годов. На основе имеющихся данных о последовательности сайта расщепления белка слияния, все вирусы генотипа III являются вирулентными. Вирусы генотипа IV включают изоляты, впервые выделенные от домашней птицы в Европе в 1933-1944 годах [41, 170]. Вирусы данной группы были преобладающими в Европе вплоть до 1970 гг. Кроме того, изоляты генотипа IV были также выявлены у домашней птицы в Африке (Судан) в 1991 году, у голубей в Азии (Гонконг) в 1989 году и у домашней птицы в России в 1970 году [18, 102]. Все представители данной генетической группы также считаются вирулентными [163].

Вторая панзоотия была вызвана вирусами генотипа V. Вирусы генотипа V, вероятно, появились в Центральной или Южной Америке в 1970-х годах и впоследствии были занесены в Европу, где распространились по всему континенту, поражая домашнюю птицу [76, 102, 120]. Вирусы этого генотипа также выявляли у домашней птицы и уток в Восточной и Западной Африке [18, 76]. Все вирусы, принадлежащие к генотипу V считаются вирулентными.

Вирусы субгенотипа VI.1.1 (VI-b) впервые были выявлены на Ближнем Востоке в 1980-х годах преимущественно у представителей Семейства *Columbidae* и были ответственны за **третью панзоотию** [85]. Вирусы данного субгенотипа в дальнейшем выявляли у голубей в Аргентине, Китае, Италии и США в 1984-2007 гг. [32, 166]. Однако были случаи выявления вирусов субгенотипа VI.1.1 (VI-b) у домашней птицы в Великобритании [30]. Изоляты данного субгенотипа также выявляли в 1970-х у голубей (а также у пустельг, соколов, какаду, волнистых попугайчиков, фазанов, лебедей и малиновки) в Европе, Южной Африке и на Дальнем Востоке [40]. Как и в случае с генотипом V, все вирусы генотипа VI являются вирулентными для домашней птицы. Вирусы этого генотипа, вероятно,

распространились в результате торговли спортивными голубями и путем естественной миграции диких голубей [25, 85].

Четвертая панзоотия НБ вызвана вирусами генотипа VII и продолжается в наше время. Генотип VII – это крупная и генетически разнообразная группа вирусов. Вирусы данного генотипа, вероятно, появились на Дальнем Востоке в 1990-х годах и впоследствии распространились в Азию, Европу, Южную Африку и Южную Америку. Вирусы этого генотипа в настоящее время разделены на субгенотипы VII.1.1, VII.1.2 и VII.2. Предполагается, что на основе данных об аминокислотной последовательности сайта нарезания белка слияния, все вирусы генотипа VII являются вирулентными. Вирусы данной генетической группы имеют большое экономическое значение для птицеводства, поскольку некоторые представители вызывали более высокую смертность среди вакцинированной домашней птицы [105], а также, возможно, расширили круг хозяев и способны вызывать более тяжелое течение болезни у гусей [90].

Субгенотип VII.1.1 выявляли с конца 1990-х годов в разных частях мира. Изоляты субгенотипа VII.1.1 неоднократно выделяли на птицеводческих хозяйствах в Китае в 1998-2017 гг. [35, 66, 77, 94, 106, 132, 136], а также во Вьетнаме (2007) и Израиле (2011-2014 гг) у кур [109, 141]. В то же время некоторые изоляты данного субгенотипа выделяли у домашних водоплавающих птиц [106, 132, 136].

Также были сообщения о выявлении вирусов данного субгенотипа от диких птиц, в том числе от голубей, из Китая и Тайваня в 1996-2000 гг. [38]. Эти данные могут свидетельствовать о возможной передаче инфекции между домашними и дикими птицами [162].

Вирусы субгенотипа VII.1.1 также выявляли среди домашней птицы в Европе, Турции, Южной Африке, Мозамбике, Казахстане, на Дальнем Востоке, в том числе в Южной Корее (2000-2005) [169], на Ближнем Востоке, в Индии, а также в Колумбии и Венесуэле в 1990-х годах и в начале 21-го века [10, 25, 163, 165], а также в последнее десятилетие в Иране [37, 154], Тайване [133], Афганистане [83],

Саудовской Аравии [26], Ираке [81], Египте [21, 68, 108, 157], Индонезии [140], Японии [96] и Вьетнаме [28, 109].

Вирусы данного субгенотипа также были обнаружены у диких птиц разных видов с клиническими признаками заболевания, в том числе у хохлатых ибисов (*Nipponia nippon*) в Китае и у других видов диких птиц в Сербии в 2006-2007 гг., что может говорить о способности вирусов этой генетической группы к высокой мобильности и широкому распространению. Эти данные также подтверждают потенциальную возможность передачи вирусов НБ от домашней птицы диким птицам и наоборот [43, 135].

Вирусы субгенотипа VII.1.2 были обнаружены у домашней птицы и голубей в Китае в 1996-2008 годах [163].

Субгенотип VII.2 изначально выявляли в странах Юго-Восточной Азии (Камбоджа, Индонезия, Малайзия) в 2007-2014 гг. [126,155], откуда он распространился в Мозамбик [134], Ботсвану [60] и Танзанию [107], а также в страны Европы и Азии: Израиль, Иорданию [141], Китай [101], Пакистан [82], Оман [84], Индию [20], Болгарию, Грузию и Бельгию [28, 103]. Существует вероятность, что вирусы данной группы произошли от вирусов, выявленных в Индонезии в 1980-х годах [120]. Вирусы данной группы также выявляли у диких птиц. Так, описан случай выявления вируса субгенотипа VII.2 у белой цапли из Китая [163]. Также вирусы данной группы выявляли у фазанов и павлинов в Пакистане в 2011-2012 гг, при этом смертность достигала 100 % [34, 64].

1.6.1 Эпизоотический процесс в Российской Федерации

На территории России вспышки НБ регистрируются с середины 20 века [7, 14]. По литературным данным в разные периоды времени выявляли разные генетические группы вируса.

Так, у домашних птиц с конца 20 века выявляли вирусы генотипа VII и его производных. В период с 1993 по 2010 гг выявляли вирусы субгенотипа VII.1.1 (по более ранней классификации, предложенной Diel et al. в 2012 г. субгенотипов VIIa и VIId), а также вирусы генотипа XIII (по более ранней классификации,

предложенной Diel et al. в 2012 г. субгенотипа VIIb) [10, 12, 16]. В 2013 году на территории Калининградской области был выявлен вирус субгенотипа VII.2 (по более ранней классификации (Diel et al., 2012 г.) субгенотипа VIIh) [15]. В 2016-2017 гг. на территории Республики Крым был также выявлен вирус субгенотипа VII.2 (по более ранней классификации (Diel et al., 2012 г.) субгенотипа VIIi) [62]. С 2019 года все вспышки НБ в России вызваны вирусами генотипа VII.1.1 (по более ранней классификации (Diel et al., 2012 г.) субгенотипа VIIl) [13, 29].

Первоначально вирусы субгенотипа VIIl были описаны исследователями из Ирана в 2016 году [80], где было показано сходство и филогенетическая близость с известным ранее субгенотипом VIId. В дальнейшем авторы [97] увеличили число изученных изолятов данной группы, показали их распространение практически по всем провинциям Ирана, а также отметили, что сходством с данной группой обладает частичная последовательность гена F, изолята, выделенного в Иране еще в 1999 г.

Среди выявленных у диких птиц изолятов вируса наблюдается большое генетическое разнообразие. В начале 20 века отмечали выявление у диких птиц (утки-кряквы, фазаны, дикие гуси и др.) вирусов генетических линий 5b и 3a. По классификации предложенной в 2019 году данные группы относятся к генотипам XII и XIII (линия 5b) и генотипу III (линия 3a) и являются потенциально вирулентными [3, 11].

Также, существуют неоднократные сообщения о выявлении изолятов генотипа I класса II. Изоляты данного генотипа были выявлены в 2001-2004, 2011, 2014, 2017-2020 гг. на территории Приморского края, Республики Саха, территорий Западной Сибири и Прикаспийского региона у диких водоплавающих птиц [3, 8, 46, 117].

Также широкое распространение на территории Российской Федерации получили вирусы генотипа VI. Изоляты данной генетической группы выявляли в 2001-2013 гг. в разных регионах страны преимущественно у голубей [2, 12, 16, 12, 39, 47].

В литературе также имеются данные о выявлении у диких птиц на территории Российской Федерации вирусов генотипа VII. В представленных источниках описано несколько таких случаев. В 2006 году вирус был выявлен в пробе от голубя на территории Республики Алаania и в 2008 году – в пробе от дикой утки на территории Республики Адыгея. Оба вируса принадлежали к генетической группе VII_d [1, 47]. В 2018 году исследователями из России и Японии впервые был выявлен вирус субгенотипа VII-L у дикого фазана в Республике Дагестан [33]. Филогенетический анализ показал высокое сходство данного изолята с вирусами той же генетической группы из Ирана и изолятами, выявленными в России на территории Московской области в 2022 г [13,29].

Ранее также сообщалось о выявлении изолятов ВНБ у диких птиц на территории Сибири в 1991-1996 гг. [145], а также в 2001 и 2006 гг на территории Астраханской области у бакланов и диких уток [6,9].

Описанные выше случаи выявления вирусов разных генетических групп у диких птиц подтверждает потенциальную возможность переноса ВНБ от диких птиц домашним и наоборот.

1.7 Заключение по обзору литературы

Ньюкаслская болезнь остается значимым заболеванием для промышленного и домашнего птицеводства во всем мире. Заболевание является эндемичным во многих странах и может приводить к 100%-ной смертности в стадах домашней птицы. Изоляты ВНБ различной степени вирулентности выявляют у разных видов домашних и диких птиц [22].

С момента первой официальной вспышки НБ, которая была зарегистрирована в 1926 году, заболевание распространилось по всему миру. На данный момент в литературе описано четыре панзоотии НБ, вызванных вирусами разных генотипов класса II [78]. Четвертая панзоотия НБ, вызванная вирусами генотипа VII, выявленными впервые в 1990-х годах, продолжается и сейчас. За последние 20 лет вирусы данного генотипа выявляли в странах Южной Америки, Африки, Европы и Азии.

На территории Российской Федерации в разные периоды времени выявляли разные субгенотипы генотипа VII и его производных. В период с 1993 по 2017 гг выявляли вирусы субгенотипов VIIa, VIIb, VIId, VIIh и VIIi, как у домашних, так и у диких птиц [5,10,15,16]. В начале 2019 года в южных регионах страны впервые у домашних птиц был выявлен вирус субгенотипа VII-L. Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей изолятов вируса с использованием базы данных GenBank показал высокое сходство с вирусами, выявленными в Иране в 2011 году [4].

Периодически, ВНБ разной степени вирулентности выявляют в популяциях диких и синантропных птиц, что требует объективной оценки биологического разнообразия вируса в России и наличия комплекса методов лабораторной диагностики, позволяющего идентифицировать этиологический агент заболевания.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Оборудование. При проведении исследований использовали следующее оборудование и аппаратуру:

- ламинар с вертикальным рециркуляционным потоком (Ламинарные системы, Россия);
- ПЦР-бокс БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» (Ламинарные системы, Россия);
- холодильник бытовой с двумя камерами (LG, Республика Корея);
- низкотемпературный холодильник с поддержанием температуры не выше минус 50 °С (Sanyo, Япония);
- программируемый амплификатор для проведения ОТ-ПЦР «Терцек»(ДНК-Технология, Россия);
- программируемый амплификатор для проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени Rotor Gene Q (Qiagen, США);
- центрифуга настольная для пробирок высокоскоростная Eppendorf AG (Eppendorf, Германия);
- центрифуга настольная для пробирок низкоскоростная Elmi CM70M (Elmi, Латвия);
- вакуумный отсасыватель с приемной емкостью Millipore (MilliporeSigma, Германия);
- термостат для пробирок Thermostat 5320 (Eppendorf, Германия);
- УФ-трансиллюминатор TCP-20.LM (Vilber Lourmat, Франция);
- спектрофотометр NanoPhotometer Pearl UV/Vis (IMPLEN, Германия);
- установка для горизонтального электрофореза (Bio-Rad Laboratories, США);
- источник постоянного тока (Bio-Rad Laboratories, США); микроволновая печь (LG, Республика Корея);
- электронные весы ЕК-4100i (AND, Республика Корея);
- заливочный столик, ванночка и набор гребенок для электрофореза;

- пипеточные дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкости в пределах от 1 до 1000 мкл (Thermo Fisher Scientific, США);
- автоматический секвенатор ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, США);
- штатив для сепарации магнитных частиц в 96-луночном планшете;
- генетический анализатор MiSeq (Illumina, США);
- овоскоп;
- термостат-инкубатор с поддержанием температуры $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха 50-90% (Sanyo, Япония);

Растворы и реактивы. При проведении исследований использовали следующие растворы и реактивы:

- наборы для выделения РНК/ДНК: «РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), RNeasy Mini Kit (Qiagen, США);
- обратная транскриптаза «Thermo Scientific Maxima H Minus Reverse Transcriptase» (Thermo Fisher Scientific, США);
- ингибитор РНКаз «RiboLock™ RNase Inhibitor» (Thermo Fisher Scientific, США);
- термостабильная Taq ДНК-полимераза GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, США);
- SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами (Синтол, Россия);
- MMLV-ревертаза (Синтол, Россия);
- ПЦР-Буфер-Б 10x для Taq ДНК-полимеразы (Синтол, Россия);
- смесь дНТФ (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ) концентрация каждого нуклеотида 25 mM (Синтол, Россия; Thermo Fisher Scientific, США);
- раствор MgCl_2 , 25 mM (Синтол, Россия);
- набор реагентов для очистки фрагментов ДНК, вырезанных из агарозного геля Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США);
- буфер TBE: 0.1M Трис (гидроксиметил) аминметан (ХИММЕД, Китай), (pH 8,3); 0,083M борная кислота (ХИМПРЕАКТИВ, Россия); 1mM EDTA (AppliChem, Германия);

- агароза легкоплавкая (AppliChem, Германия);
- 0,07% раствор бромида этидия (BioFroxx, Германия);
- маркер длин ДНК GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США);
- раствор для деконтаминации поверхностей RNase AWAY® (Thermo Fisher Scientific, США);
- набор для секвенирования BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США);
- набор реагентов для очистки фрагментов ДНК после реакции секвенирования по Сэнгеру Wizard® MagneSil® Sequencing Reaction Clean-Up System (Promega, США);
- олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды (производство Синтол, Россия);
- 96% этиловый спирт (этанол);
- набор референтных антигенов и сывороток против 16 подтипов гемагглютинаина ВГП (H1-H16) производства Института зоопрофилактики Венеции, Италия (IZISVe) и Голландской академии Девентера, Нидерланды (GD);
- набор референтных антигенов и сывороток против 8 серотипов парамиксовируса птиц (APMV 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9) производства Института зоопрофилактики Венеции, Италия (IZISVe);
- 1% суспензия эритроцитов петуха;
- вода деионизованная (бидистиллированная);
- фосфатно-буферный раствор (ФБР) (pH=7,2-7,4);
- дезинфицирующее средство.

Материалы. При проведении исследований использовали следующие материалы: контейнеры для биоматериала, стерильные ножницы и пинцеты, одноразовая одежда (халат, шапочка, маска, бахилы), шприцы инъекционные однократного применения, одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеточных дозаторов на 2 мкл, 10 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 200 (или 300) мкл, 1000 мкл; полипропиленовые пробирки объемом от 0,2 мл до 2,0 мл; оптические 96-

луночные планшеты для ПЦР и резиновые крышки к ним; планшеты 96-луночные с объемом лунок 220 мкл, одноразовые латексные и нитриловые перчатки.

Пробы. В работе были использованы пробы биологического материала птиц (внутренние органы, клоакальные и трахеальные мазки, помёт), отобранные в 2019-2023 гг. на птицефабриках, в ЛПХ граждан и у диких птиц. Пробы для исследований были направлены в Референтную лабораторию вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» специалистами ветеринарных служб в рамках государственного эпизоотологического мониторинга, в том числе в рамках программы «Идентификация рисков», а также в случае подозрения на вспышку НБ. Всего было исследовано 29091 проба (19545 проб от домашней птицы, 9546 проб от дикой птицы).

Приготовление суспензии. Исследуемый материал (пробы внутренних органов, трахеальные и клоакальные смывы, образцы фекалий) измельчали (при необходимости) при помощи стерильных ножниц и помещали в пластиковый контейнер для биоматериала. Полученную массу взвешивали и разводили стерильным ФБР для получения 10-20 % суспензии. Далее, суспензию переносили в пробирки объемом 1,5 мл и 2 мл и центрифугировали при 1000-2000 g в течении 15 минут. Полученные суспензии органов использовали для дальнейшего выделения суммарной РНК и для выделения вируса, далее хранили при температуре не выше -50°С до использования.

Выделение вирусов и идентификация в РТГА. Выделение вирусов проводили в 9-11-суточных куриных эмбрионах, свободных от специфических патогенов, (СПФ-КЭ) фирмы «Valo Biomedica» (Германия) согласно рекомендациям ВОЗЖ и в соответствии с «Методическими рекомендациями по выделению вирусов гриппа птиц и ньюкаслской болезни в развивающихся эмбрионах кур» (2016). Из биологического материала птиц готовили 10% суспензию с использованием фосфатно-буферного раствора (ФБР) (рН=7,2-7,4). Полученную суспензию центрифугировали при 5000 об/мин в течении 5 минут. Образовавшуюся надосадочную жидкость переносили в чистые пробирки и добавляли антибиотики (смесь: пенициллин 1000-2000 ед/см³, стрептомицин 50-

100 мг/см³, амфотерицин В 1000-3000 ед/см³) в концентрации, соответствующей инструкции производителя, и инкубировали при температуре 22-26 °С 30-60 минут. Для проб кишечника, фекалий или клоакальных смывов концентрацию антибиотиков и время инкубации увеличивали в 2 раза. Надосадочную жидкость вводили в аллантоисную полость СПФ-КЭ в объёме 0,1 см³. СПФ-КЭ инкубировали при температуре 35-37°С в течение 2-4 дней. Ежедневно эмбрионы овоскопировали и регистрировали состояние. По истечении времени инкубации эмбрионы охлаждали в течение 12-24 часов при температуре 2-6°С и использовали для сбора экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) и проведения дальнейших исследований в реакциях гемагглютинации (РГА) и торможения гемагглютинации (РТГА). При титре менее 1:16 или полном отсутствии гемагглютинации эритроцитов проводили не менее еще одного пассажа, используя для заражения ЭЭЖ от КЭ предыдущего пассажа.

Определение титра инфекционной активности. Из исследуемого вирусного материала готовили ряд десятикратных разведений путем последовательного переноса вирусосодержащего материала от 10⁻¹ разведения, до 10⁻¹⁰ при помощи стерильных одноразовых пипеток. Каждое разведение вируса вводили в аллантоисную полость четверым 10-суточным СПФ-КЭ. Зараженные КЭ инкубировали при 37°С и относительной влажности воздуха 50-80% в течение 96 часов, ежедневно просматривая и отбирая погибших. Спустя 12 часов охлаждения при 2-6°С, каждый эмбрион вскрывали стерильными пинцетами и ножницами и отбирали пробы ЭЭЖ для проведения дальнейших исследований. Специфичность гибели подтверждали путем исследования в РГА полученных образцов ЭЭЖ. Титр вируса в исходном материале традиционно определяли по методу Кербера и выражали в единицах ЭИД₅₀/см³.

Выделение РНК. Для исследований использовали 10-20% суспензию биоматериала птиц, приготовленную с помощью ФБР, трахеальные и клоакальные мазки от птиц и ЭЭЖ СПФ-КЭ. Суммарную РНК выделяли из 0,1 мл пробы с помощью набора «РИБО-сорб» или набора «RNeasy Mini Kit» согласно инструкции производителя. Выделенную РНК использовали в течение трех суток для

постановки полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) (допускается хранение при +4°C), далее хранили при температуре не выше -15°C до использования, но не более 1 года или при температуре – 70°C, до использования и не более двух лет.

ОТ-ПЦР-РВ проводили в одну стадию с использованием следующих реактивов: SynTaq ДНК-полимеразы, MMLV-ревертазы, ПЦР-Буфера-Б 10х, смеси дНТФ, раствора MgCl₂ 25 мМ, воды, свободной от РНКаз, олигонуклеотидных праймеров (M4100F 5'-agt-gat-gtg-ctc-gga-cct-tc-3' и M4220R 5'-atc-gtt-tac-gga-gag-gag-tcc-3') и флуоресцентного зонда (M4169 5'-ttc-tct-agc-agt-ggg-aca-gcc-tgc-3') [50] в программируемом амплификаторе.

Приготовление реакционной смеси для проведения ОТ-ПЦР-РВ в расчете на одну реакцию (V= 20,0 мкл):

деионизованная вода	10,6 мкл;
ПЦР-Буфера-Б 10х	2,5 мкл;
раствор MgCl ₂ 25 мМ	3,0 мкл;
раствор дНТФ 25 мМ	0,4 мкл;
раствор прямого праймера 10 пмоль/мкл.	1,0 мкл;
раствор обратного праймера 10 пмоль/мкл.	1,0 мкл;
флуоресцентный зонд 10 пмоль/мкл	0,75 мкл;
SynTaq ДНК-полимераза	0,25 мкл;
MMLV-ревертаза	0,5 мкл.

Перемешивали и центрифугировали приготовленную реакционную смесь и распределяли по 20 мкл в необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл. В последнюю очередь к смеси добавляли 5 мкл выделенной РНК соответствующей пробы биологического материала. Таким образом, общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

Устанавливали пробирки в ротор и программировали амплификатор, отмечая температурно-временные параметры реакции, флуоресцентный зонд FAM. Температурно-временной режим для ОТ-ПЦР-РВ представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры ОТ-ПЦР-РВ

Стадии реакции	Температура, °С	Время	Количество циклов
Обратная транскрипция	40	20 мин.	1
Активация полимеразы	95	8 мин.	1
Денатурация	95	10 с	40
Отжиг праймеров	55	35 с	
Элонгация	72	10 с	

Сигнал флуоресцентного красителя FAM регистрировали в каждом цикле ОТ-ПЦР-РВ на шаге отжига праймеров (55°C). Все значения Ct (пороговая линия) определяли только у тех флуоресцентных сигналов, которые поднимались выше флуоресцентного шума и имели вид экспоненциальных кривых.

ОТ-ПЦР для определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена F с использованием SynTaq ДНК-полимеразы, MMLV-ревертазы, ПЦР-Буфера-Б 10х, смеси дНТФ, раствора MgCl₂ 25 мМ, воды, свободной от РНКаз, олигонуклеотидных праймеров (прямого праймера D1 5'-cca-ttg-atg-gca-ggc-ctc-tt-3' и обратного праймера D2 5'-ccg-cta-ccg-att-aat-gag-ct-3') в программируемом амплификаторе.

Приготовление реакционной смеси для проведения ОТ-ПЦР в расчете на одну реакцию (V= 20,0 мкл):

деионизованная вода	11,35 мкл;
ПЦР-Буфер-Б 10х	2,5 мкл;
раствор MgCl ₂ 25 мМ	3,0 мкл;
раствор дНТФ 25 мМ	0,4 мкл;
раствор прямого праймера 10 пмоль/мкл.	1,0 мкл;
раствор обратного праймера 10 пмоль/мкл.	1,0 мкл;
SynTaq ДНК-полимераза	0,25 мкл;
MMLV-ревертаза	0,5 мкл.

Перемешивали и центрифугировали приготовленную реакционную смесь и распределяли по 20 мкл в необходимое количество пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл. В последнюю очередь к смеси добавляли 5 мкл выделенной РНК

соответствующей пробы биологического материала. Таким образом, общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

Поверх смеси наслаивали 30 мкл минерального масла, чтобы исключить возможность ее испарения, даже в случае использования амплификатора с подогреваемой крышкой. Центрифугировали пробирки.

Устанавливали пробирки в амплификатор, с определенным температурно-временным режимом (таблица 3).

Таблица 3 – Параметры ОТ-ПЦР

Стадии реакции	Температура, °C	Время	Количество циклов
Обратная транскрипция	40	25 мин.	1
Активация полимеразы	95	5 мин.	1
Денатурация	95	20 с	40
Отжиг праймеров	55	30 с	
Элонгация	72	40 с	

Результаты ПЦР учитывали путем анализа продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

ОТ-ПЦР для определения полных нуклеотидных последовательностей генов F и HN. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием набора реактивов «Maxima H Minus Reverse Transcriptase» (включает RT-буфер, ревертазу Maxima H), ингибитора РНКаз «RiboLock™ RNase Inhibitor», раствора дНТФ, бидистиллированной воды, свободной от РНКаз, олигонуклеотидного прямого праймера FVII-287F (Приложение 1) для амплификации генов F и HN в программируемом амплификаторе.

Реакцию обратной транскрипции проводили в два этапа. На первом этапе в стерильной пробирке смешивали компоненты реакционной смеси на одну пробу (V=9,5 мкл) в следующих пропорциях:

раствор прямого праймера (FVII-287F) 10 пмоль/мкл	2 мкл;
раствор дНТФ 10 мМ	1 мкл;
бидистиллированная вода	6,5 мкл.

Перемешивали и центрифугировали приготовленную реакционную смесь и распределяли по 9,5 мкл в соответствующее количество пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл. В пробирки с реакционной смесью добавляли 5 мкл выделенной РНК.

Поверх смеси наслаивали 30 мкл минерального масла, чтобы исключить возможность ее испарения, даже в случае использования амплификатора с подогреваемой крышкой. Центрифугировали пробирки.

Устанавливали пробирки в амплификатор и инкубировали 5 минут при 65°C, затем помещали в штатив в морозильную камеру при -20°C на 1 минуту.

На втором этапе реакции ОТ в новой стерильной пробирке смешивали компоненты реакционной смеси на одну пробу (V=5,5 мкл) в следующих пропорциях:

RT Буфер 5X	4,0 мкл;
Ингибитор РНКаз (RNase Inhibitor) 20U	0,5 мкл;
Ревертаза Maxima 200U	1,0 мкл.

Перемешивали и центрифугировали приготовленную реакционную смесь. В пробирки с предыдущего этапа добавляли по 5,5 мкл полученной реакционной смеси (общий конечный объем 20 мкл), перемешивали и центрифугировали.

Устанавливали пробирки в амплификатор и задавали программу со следующим температурно-временным режимом реакции: обратная транскрипция – 30 мин при 50°C, инаktivация ревертазы – 5 мин при 85°C.

ПЦР проводили в 2 стадии с использованием фермента Taq-ДНК-полимеразы, буфера 5x для ПЦР, 25 mM р-ра хлорида магния, бидистиллированной воды, свободной от РНК-аз, раствора дНТФ, растворов олигонуклеотидных праймеров для амплификации фрагментов генов F и HN (Приложение 1) в программируемом амплификаторе.

На 1-ой стадии ПЦР проводили амплификацию фрагмента полученной кДНК, включающего гены F и HN, используя прямой праймер FVII-287f и обратный праймер HNVII3358r.

Приготовление реакционной смеси для проведения 1-ой стадии ПЦР в пробирке в расчете на одну реакцию ($V=23$ мкл) при использовании реактивов фирм Promega или Thermo Fisher Scientific:

деионизированная вода	11,75 мкл;
буфер 5x для ПЦР	5,0 мкл;
раствор $MgCl_2$ 25 мМ	3,0 мкл;
раствор дНТФ 10 мМ	1,0 мкл;
раствор прямого праймера FVI-210f 10 пмоль/мкл	1,0 мкл;
раствор обратного праймера HNVI3898r 10 пмоль/мкл	1,0 мкл;
Taq-ДНК-полимераза	0,25 мкл.

Перемешивали и центрифугировали приготовленную реакционную смесь и распределяли по 23 мкл в соответствующее количество пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл. В последнюю очередь к смеси добавляли 2 мкл кДНК после реакции ОТ. Общий объем реакции составляет 25 мкл.

Поверх смеси наслаивали 30 мкл минерального масла, чтобы исключить возможность ее испарения, даже в случае использования амплификатора с подогреваемой крышкой. Центрифугировали пробирки.

Устанавливали пробирки в амплификатор и устанавливают необходимую программу. Температурно-временной режим ПЦР представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Параметры 1-ой стадии ПЦР для амплификации фрагментов генов F и HN изолятов ВНБ генотипа VII

Стадии реакции	Температура, °C	Время	Количество циклов
Активация полимеразы	95	2 мин	1
Денатурация	95	20 с	40
Отжиг праймеров	55	30 с	
Элонгация	72	4 мин 20 с	
Дополнительная элонгация	72	10 мин	1

На 2-ой стадии ПЦР проводили амплификацию фрагментов ДНК, используя пары праймеров, представленные в таблице 5. Прямой праймер маркирован буквой f, обратный – r.

Таблица 5 – Олигонуклеотидные пары праймеров, используемые для амплификации фрагментов генов F и HN изолятов ВНБ в ПЦР

№ фрагмента	Пары праймеров для ПЦР	Длина фрагмента н.п.
1	FVII-54f – FVII397r	451
2	FVII181f – FVII775r	594
3	FVII646f – FVII1048r	402
4	FVII972f – FVII1327r	355
5	FVII1239f – FVII1782r	543
6	HNVII1624f-HNVII2139r	515
7	HNVII2111f-HNVII2348r	237
8	HNVII2244f-HNVII2799r	555
9	HNVII2748f-HNVII3417r	669
10	HNVII3330f-HNVII3833r	503

Приготовление реакционной смеси для проведения 2-ой стадии ПЦР в пробирке в расчете на одну реакцию (V=20 мкл) при использовании реактивов фирм Promega или Thermo Fisher Scientific:

деионизированная вода	8,75 мкл;
буфер 5x для ПЦР	5,0 мкл;
раствор MgCl ₂ 25 mM	3,0 мкл;
раствор дНТФ 10 mM	1,0 мкл;
раствор прямого праймера	1,0 мкл;
раствор обратного праймера	1,0 мкл;
Taq-ДНК-полимераза	0,25 мкл.

Перемешивали и центрифугировали приготовленную реакционную смесь и распределяли по 20 мкл в соответствующее количество пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл. В последнюю очередь к смеси добавляли 5 мкл ДНК после 1-ой стадии ПЦР. Общий объем реакции составляет 25 мкл.

Поверх смеси наслаивали 30 мкл минерального масла, чтобы исключить возможность ее испарения, даже в случае использования амплификатора с подогреваемой крышкой. Центрифугировали пробирки.

Устанавливали пробирки в амплификатор и задавали необходимую программу. Температурно-временной режим ПЦР представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Параметры 2-ой стадии ПЦР для амплификации фрагментов генов F и HN изолятов ВНБ

Стадии реакции	Температура, °C	Время	Количество циклов
Активация полимеразы	95	2 мин	1
Денатурация	95	20 с	30
Отжиг праймеров	55	30 с	
Элонгация	72	40 с	

Результаты ПЦР учитывали путем анализа продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Электрофорез в агарозном геле.

Приготовление 1% агарозного геля. Для приготовления 1% агарозного геля взвешивали 1 г агарозы, помещали в колбу, заливали 100 мл ТВЕ-буфера, ставили в микроволновую печь и доводили до кипения до полного растворения агарозы. Охлаждали раствор до 45-50°C, добавляли 3 мкл 0,01% раствора бромида этидия.

Вставляли гребенки в ванночку для электрофореза, заливали и давали гелю затвердеть (15-20 мин.). После полного затвердевания агарозный гель в ванночке переносили в камеру для горизонтального электрофореза. Заливали в камеру ТВЕ-буфер так, чтобы он покрывал гель на 2-3 мм.

Электрофорез продуктов амплификации. Пробирки с исследуемыми образцами после завершения амплификации центрифугировали, и, в случае использования прозрачного буфера для ПЦР, добавляли в пробы 5 мкл красителя из набора маркера длин ДНК. Всю смесь (за исключением минерального масла) вносили в лунки агарозного геля. Электрофорез проводили при напряжении 15 В/см длины геля в течении 15 минут.

Результаты электрофореза учитывали на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Амплифицированные фрагменты ДНК выявляли в виде светящихся оранжевых полос. Постановка электрофореза осуществлялась с маркером молекулярного веса.

Амплифицированные в ПЦР фрагменты ДНК вырезали из геля скальпелем и очищали с помощью набора Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System согласно

инструкции производителя. Измеряли оптическую плотность очищенных ДНК-фрагментов.

Нуклеотидное секвенирование по Сэнгеру. Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов F и HN изолятов вируса БН осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130xl с использованием готовых наборов различных модификаций производства Applied Biosystems. Температурно-временной режим для реакции секвенирования включает следующие стадии: активация полимеразы – 2 мин при 95°C, далее 25 циклов ПЦР, состоящие из денатурации – 30 сек при 95°C, отжига праймеров – 20 сек при 55°C и элонгации – 1 мин при 60°C.

Полногеномное секвенирование. Полногеномное секвенирование осуществляли с помощью генетического анализатора MiSeq (Illumina), согласно инструкции производителя. Для приготовления библиотек использовали коммерческие наборы Nextera XT(Illumina), Nextera XT Index Kit (Illumina).

Филогенетический анализ. Выравнивание и редактирование полученных нуклеотидных последовательностей осуществляют с помощью программного обеспечения BioEdit (версия 7.2.). Филогенетический анализ осуществляли методом наибольшего правдоподобия (Maximum Likelihood) при использовании модели НКУ [100]. Проверка устойчивости филогении проводилась методом «бутстреп» (500 повторностей). Для моделирования различий скоростей эволюции сайтов использовали дискретное гамма-распределение. Анализ проводили с помощью программы MEGA X (10.2.6).

Определение скорости накопления точечных мутаций и времени наступления основных филогенетических событий. Для определения скорости генетической изменчивости изолятов и времени возникновения российской ветви генотипа VII.1.1. использовали байесовский анализ последовательностей гена F и программу BEAST (v.1.10.4) (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees). Был исследован набор из полных последовательностей открытой рамки считывания

гена F 29 российских изолятов и иранского штамма Beh (2011 г). (MF417546.1) для укоренения полученного дерева. Российские изоляты были выделены в особую группу для определения времени существования их ближайшего общего предка. Были использованы модели нуклеотидных замен GTR и HKY и гамма-распределение скоростей замен (5 категорий), эмпирическая частота нуклеотидов, разбиение кодона на позиции 1, 2 и 3, строгий (Strict clock) и некоррелированный мягкий (Uncorrelated relaxed clock) варианты молекулярных часов. Остальные параметры модели заданы по умолчанию. Для оценки параметров модели марковская цепь метода Монте-Карло рассчитывалась для 50 миллионов итераций, чтобы эффективный размер выборки для каждого был не меньше 200. Для расчета оценок параметров по результатам работы программы BEAST использовали программу Tracer 1.7.2. [143].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ свойств изолятов вируса ньюкаслской болезни, выявленных на территории РФ в 2019-2023 гг.

В 2019-2023 гг. 29091 проба биологического материала птиц (19543 пробы от домашней птицы, 9548 проб от дикой птицы) из 78 регионов РФ были исследованы методом ОТ-ПЦР-РВ на наличие генома ВНБ.

Пробы биологического материала положительные в ОТ-ПЦР-РВ далее исследовали методами ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования для определения последовательности сайта расщепления белка слияния F, а также принадлежности выявленных изолятов к определенной генетической группе. Результаты исследования проб представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты исследования проб биологического материала на наличие генома ВНБ методами ОТ-ПЦР-РВ, ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования в 2019-2023 гг

№	Регион	Количество положительных проб (генетическая группа) /общее количество проб				
		2019 г	2020 г	2021 г	2022 г	2023 г
1	2	3	4	5	6	7
Центральный Ф.О.						
1	Владимирская обл.	1(II) /303	27(I-II, 26-VII.1.1) /159	4(2-I.2, 2-VII.1.1) /226	2(VII.1.1) /135	12(VII.1.1) /160
2	Ивановская обл.	0/91	0/70	0/93	0/79	0/106
3	Костромская обл.	0 /171	0 /148	1(I.1.2.1) /76	2(I.1.2.1) /65	2(I.1.2.1) /83
4	Орловская обл.	0/45	0/30	0/37	0/34	0/51
5	Курская обл.	7(VII.1.1)/57	5(VII.1.1)/30	2(I.1.1)/139	3(II)/57	0/50
6	Смоленская обл.	0/50	0/23	0/30	0/30	0/46
7	Брянская обл.	0/50	0/50	0/34	0/0	0/0
8	Ярославская обл.	0/74	0/70	0/50	0/50	0/49
9	Воронежская обл.	0/20	0/30	0/43	12(II)/97	0/23
10	Рязанская обл.	0/0	0/24	0/36	1(I.1.1)/28	0/20
11	Белгородская обл.	0/0	0/63	0/66	0/75	0/73
12	Московская обл.	0/3	0/15	0/25	0/3	2(II)/8
13	Тамбовская обл.	0/0	0/0	0/27	0/7	0/0
14	Калужская обл.	0/0	0/14	0/34	0/33	0/6
15	Тверская обл.	0/0	0/15	0/22	0/2	0/45

1	2	3	4	5	6	7
Приволжский Ф.О.						
16	Респ. Башкортостан	0 /50	0 /58	0 /50	16(VII.1.1) /60	0 /100
17	Нижегородская обл.	0 /200	0 /250	1(VII.1.1) /151	0 /107	2(VII.1.1) /128
18	Респ. Татарстан	23(I.1.1) /98	2(XXI.1.1) /245	6(I.1.1) /195	3(I.1.1) /150	1(II) /121
19	Пермский край	0/57	0/70	0/32	0/40	0/42
20	Пензенская обл.	0/80	0/96	0/200	0/90	0/120
21	Респ. Чувашия	0/249	0/245	0/153	0/100	0/98
22	Самарская обл.	0 /65	0 /72	10(I.1.1) /103	3(1-I.1.1, 2-VII.1.1) /61	9(VII.1.1) /81
23	Кировская обл.	0 /85	0 /85	0 /97	28(I.1.1) /120	0 /134
24	Ульяновская обл.	0/57	0/36	0/30	0/300	0/30
25	Оренбургская обл.	0/50	0/53	0/54	0/52	0/51
26	Респ. Удмуртия	0/50	0/50	1(II)/58	4(II)/50	0/69
27	Саратовская обл.	2(VII.1.1) /2	0 /31	0 /53	13(VII.1.1) /33	0 /20
28	Респ. Марий Эл	0 /50	0 /50	0 /47	0 /50	7(VII.1.1) /76
29	Респ. Мордовия	0 /58	0 /210	0 /122	0 /100	9(I.1.1) /130
Уральский Ф.О.						
30	Челябинская обл.	0/50	1(I.1.2.1)/39	0/138	0/73	0/71
31	Курганская обл.	0/50	0/109	0/93	0/64	0/106
32	Свердловская обл.	0/58	0/50	0/107	0/123	0/90
33	Тюменская обл.	0 /60	0 /123	4(II) /186	18(15- I.1.1,3-II) /250	9(I.1.1) /330
34	Ямало-Ненецкий АО	0/100	0/100	0/102	1(I.2)/105	0/123
35	Ханты-Мансийский АО	0 /50	0 /52	2(VII.1.1) /72	3(I.1.1) /83	1(VII.1.1) /80
Сибирский Ф.О.						
36	Кемеровская обл.	0/50	0/50	1(I.1.1)/50	0/50	0/50
37	Респ. Тыва	0/125	0/125	0/125	0/100	0/100
38	Алтайский край	0/200	0/100	0/100	0/100	0/100
39	Респ. Алтай	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
40	Красноярский кр.	0 /211	7(II) /202	0 /200	0 /200	8(5-I.1.1,3-II) /182
41	Забайкальский кр.	2(VII.1.1) /100	0 /89	0 /146	0 /101	0 /107
42	Иркутская обл.	0 /50	10(I.1.1) /70	0 /70	0 /90	8(5-I.1.1,1-II,2-VII.1.1) /92
43	Омская обл.	7(VII.1.1) /103	0 /188	0 /100	2(II) /92	0 /85
44	Респ. Бурятия	0/40	0/48	0/40	0/67	0/50
45	Томская обл.	0 /0	0 /47	0 /30	3(I.1.2.1) /65	0 /60

1	2	3	4	5	6	7
46	Новосибирская обл.	0/13	0/56	0/63	0/68	0/50
47	Респ. Хакасия	0/10	0/10	0/34	1(I.2)/35	0/30
Южный Ф.О.						
48	Краснодарский кр.	2(VII.1.1)/122	0 /100	0 /101	0 /125	0 /108
49	Волгоградская обл.	0 /100	0 /118	0 /100	4(I-II, 3-XXI.1.1)/100	0 /100
50	Астраханская обл.	0/150	0/100	0/112	0/101	0/101
51	Ростовская обл.	0/206	0/153	0/112	0/127	0/100
52	Респ. Адыгея	0/30	0/30	0/30	0/25	0/30
53	Респ. Калмыкия	0/0	0/10	0/15	0/0	0/1
54	Херсонская обл.	0/0	0/0	0/0	0/0	0/131
Северо-Кавказский Ф.О.						
55	Респ. Чечня	3(VII.1.1)/13	1(VII.1.1)/20	0/20	0/20	0/20
56	Ставропольский кр.	3(VII.1.1)/126	1(III)/113	0 /183	0 /157	0 /115
57	Респ. Ингушетия	0/50	3(VII.1.1)/53	0/35	0/8	0/64
58	Карачаево-Черкесская Респ.	0/70	0/71	0/50	0/50	0/45
59	Респ. Дагестан	0/53	0/12	0/24	0/34	0/1
Дальневосточный Ф.О.						
60	Амурская обл.	0/100	19(I.2)/100	0/100	1(I.2)/101	0/100
61	Приморский кр.	5(VII.1.1)/156	0 /322	1(VII.1.1)/123	0 /239	0 /136
62	Хабаровский кр.	0 /66	0 /75	0 /210	0 /198	2(VII.1.1)/128
63	Сахалинская обл.	0/50	0/30	0/30	0/60	0/67
64	Респ. Саха	0/50	0/75	0/75	0/100	0/160
65	Еврейская авт. обл.	0/25	0/50	0/50	0/50	0/64
66	Камчатский край	0/50	0/81	0/103	0/0	0/124
67	Чукотский АО	0/25	0/44	0/70	0/70	0/70
68	Магаданская обл.	0/0	0/25	0/0	0/30	0/33
Северо-Западный Ф.О.						
69	Калининградская обл.	0/50	0/50	0/54	2(II)/105	0/83
70	Вологодская обл.	0/55	1(II)/56	0/20	0/27	0/46
71	Мурманская обл.	0/50	0/50	0/50	0/51	0/50
72	Ленинградская обл.	0/115	0/70	0/95	3(I.1.1)/71	0/71
73	Псковская обл.	0/3	0/25	0/30	1(II)/25	0/20
74	Архангельская обл.	0/50	0/50	0/29	0/32	1(I.1.1)/30
75	Респ. Карелия	0/63	0/63	0/69	0/80	0/81
76	Респ. Коми	0 /70	0 /70	0 /70	0 /74	4(3-I.1.2.1, I-II)/143
77	Новгородская обл.	0 /50	0 /50	0 /60	0 /50	18(I.1.1)/51
78	Ненецкий АО	0/50	0/40	0/40	0/60	0/60
Всего за год		55/5313	77/5886	33/6029	126/5874	95/5989

Геном ВНБ был выявлен в 386 пробах (348 проб от домашней птицы, 38 проб от дикой птицы). В 35 регионах РФ из 78 обследованных геном ВНБ не выявляли на протяжении 2019-2023 гг. В то же время в некоторых других регионах (Республика Татарстан, Владимирская и Курская области) случаи выявления различных генетических групп ВНБ происходили неоднократно в течение 5 лет.

Вакцинные штаммы субгенотипов I.1.1 и I.1.2.1 были выявлены в пробах от кур и других домашних птиц в Иркутской, Самарской, Кемеровской, Курской, Ленинградской, Кировской, Тюменской, Томской, Костромской, Челябинской, Архангельской, Новгородской и Рязанской областях, в Республиках Татарстан и Коми, в Красноярском крае и Ханты-Мансийском автономном округе в 2019-2023 гг. (156 проб). Вакцинные штаммы генотипа II выявлены в пробах от кур из Владимирской, Вологодской, Тюменской, Волгоградской, Псковской, Курской, Калининградской, Московской, Иркутской и Воронежской областях, в Республиках Татарстан, Коми и Удмуртия и Красноярском крае, а также в пробах от индеек в Омской области в 2019-2023 годах (51 проба). Вакцинный штамм генотипа III был выделен в пробе от курицы в Ставропольском крае в 2020 году (1 проба).

Также в 2023 г в пробах от сизых голубей из Республики Мордовия был выявлен вакцинный штамм субгенотипа I.1.1 (9 проб).

Сайт расщепления всех выявленных вакцинных штаммов имел структуру 112-GKQGR[^]L-117, что характерно для авирулентных форм ВНБ.

Вирусы субгенотипа XXI.1.1 (VI-g) были выявлены в пробах от голубей из Республики Татарстан в 2020 г (2 пробы) и из Волгоградской области в 2022 году (3 пробы). Сайт расщепления вирусов субгенотипа XXI.1.1 имел структуру 112-KRQKR[^]F-117, что характерно для вирулентных форм ВНБ.

Авирулентные вирусы генотипа I.2 были выявлены в пробах от диких водоплавающих птиц и фазана из Амурской и Владимирской областей в 2020-2022 гг и от диких уток из Ямало-Ненецкой автономной области и Республики Хакасия в 2022 году (24 пробы). Сайт расщепления вирусов генотипа I.2 имел структуру 112-GKQGR[^]L-117, что характерно для авирулентных форм ВНБ.

Собранные данные свидетельствуют о широком распространении и доминировании в РФ субгенотипа VII.1.1 в период 2019-2023 гг. Вирусы субгенотипа VII.1.1 были выявлены в Краснодарском, Ставропольском, Приморском и Забайкальском краях, Республиках Чечня, Башкортостан и Ингушетия, Саратовской, Самарской, Омской, Курской, Владимирской и Нижегородской областях и Ханты-Мансийском АО (140 проб). Сайт расщепления вирусов субгенотипа VII.1.1 имел структуру 112-RRQKR^F-117, что характерно для вирулентных форм ВНБ.

Регионы РФ, в которых был обнаружен *AOAV-1*, показаны на рисунке 3.



Рисунок 3 - Регионы РФ, в которых был выявлен ВНБ в 2019-2023 гг.

Видовой состав птиц, от которых были получены образцы биологического материала, а также количество проб представлен в таблице 8.

Наибольшее количество образцов от домашней птицы было получено от кур – 15308 проб, что составляет 78,33% от количества проб, полученных от домашних птиц, и 52,62% от общего количества полученных проб. Геном ВНБ был выявлен в 314 пробах от кур. Также были исследованы 490 проб от индеек, 337 проб от перепелов, 1245 проб от домашних гусей и уток и 2163 пробы от других домашних

птиц (цесарок, мускусных уток и т.д.). Геном ВНБ был выявлен в 3 пробах от индеек, в 1 пробе от перепела и в 30 пробах от других домашних птиц.

Таблица 8 – Количество проб биологического материала, полученных от разных видов птиц

Виды птиц	Количество положительных проб/общее количество проб					
	2019	2020	2021	2022	2023	Всего
Домашняя птица						
Курица	51/ 2395	48 /2784	31 /3325	99/37 09	85 /3095	314 /15308
Индейка	0/74	1/162	0/87	2/112	0/55	3/490
Перепел	0/53	0/50	0/41	0/96	1/97	1/337
Домашние гуси и утки	0/ 251	0/296	0/263	0/151	0/284	0/1245
Другие виды домашних птиц (цесарка, мускусная утка и т.д.)	4 /516	7/448	0/444	19/31 5	0/440	30/2163
Всего проб от домашних птиц	55 /3289	56 /3740	31 /4160	120 /4383	86 /3971	348 /19543
Дикая птица						
Дикие утки	0 /524	0/408	0/318	1/267	0/332	1/1849
Утка-кряква	0 /259	2/126	2/198	0/279	0/156	4/1018
Дикие гуси	0 /173	1/247	0/179	0/140	0/170	1/909
Утка-чирок	0/93	1/59	0/143	1/106	0/62	2/463
Виды семейства <i>Утиные</i>	0/58	15/78	0/203	0/67	0/129	15/535
Другие виды водоплавающих и околоводных птиц (чайки, поганки, бакланы и т.д.)	0 /433	0 /587	0/410	0/106	0/354	0 /1890
Сизый голубь	0 /177	2/343	0/243	3/244	9/457	14 /1464
Виды отряда воробьинообразных (вороны, галки и воробьиные)	0/95	0/106	0/44	0/82	0/140	0/467
Вальдшнеп	0 /102	0/38	0/26	0/38	0/28	0/232
Другие виды диких птиц (чибис, фазан и др.)	0 /110	0/154	0/105	1/162	0/190	1/721
Всего проб от диких птиц	0 /2024	21 /2146	2 /1869	6 /1491	9 /2018	38 /9548
Всего проб за год	55 /5313	77 /5886	33 /6029	126 /5874	95 /5989	386 /29091

Наибольшее количество образцов биологического материала от диких птиц было получено от диких водоплавающих птиц, включая виды отряда гусеобразных

– 6664 пробы, что составляет 69,79% от количества проб, полученных от диких птиц, и 22,91% от общего количества полученных проб. В эту группу входят образцы, полученные в основном от видов семейства *Утиные* – уток, крякв, диких гусей, чирков и др. Геном ВНБ был выявлен в 23 пробах: в 1 пробе от дикой утки, в 4 пробах от утки-кряквы, в 2 пробах от утки-чирка, в 1 пробе от дикого гуся и в 15 пробах от других видов семейства *Утиные*. Также были исследованы образцы других диких водоплавающих и околоводных птиц (чаек, поганок, бакланов и т.д.) – в общей сложности 1890 образцов.

За период 2019-2023 гг. также было исследовано 1464 пробы от сизых голубей и 1420 проб от других видов диких птиц, включая галок, ворон, воробьев, вальдшнепа, чибисов, фазанов и т.д. Геном ВНБ был выявлен в 14 пробах от сизых голубей и в 1 пробе от дикого фазана.

Филогенетическое положение выявленных изолятов ВНБ представлено на рисунке 4, их принадлежность к субгенотипам в таблице 9.

Таблица 9 – Филогенетическая принадлежность изолятов и вакцинных штаммов ВНБ, выявленных в РФ в 2019-2023 гг.

№ п/п	Количество изолятов / вакцинных штаммов	Субгенотип
1	141	VII.1.1 (VII-L)
2	5	XX.1.1 (VI-g)
3	1	III
4	51	II
5	156	I.1.1
6	8	I.1.2.1
7	23	I.2

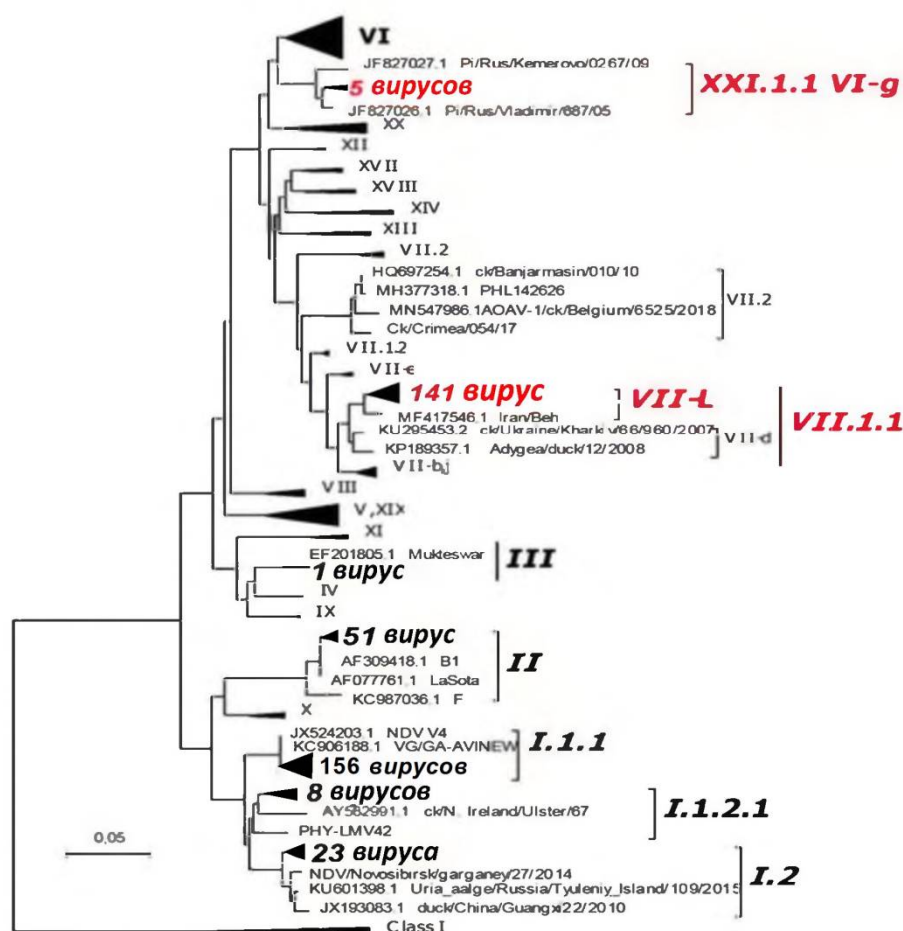


Рисунок 4 - Филогенетическое положение изолятов ВНБ, выявленных в РФ в 2019-2023 гг. (нуклеотиды 203–550 ОРС гена F)

Таким образом, можно выделить основные генетические группы ВНБ, циркулирующие на территории РФ:

1. Вирулентные вирусы генотипа VII, выявляемые у домашней птицы в ЛПХ граждан;
2. Вирулентные изоляты генотипа VI и его производных, циркулирующие в популяциях голубей;
3. Лентогенные и реже мезогенные вакциноподобные вирусы генотипов I, II и III;
4. Авирулентные вирусы генотипа I класса II, выявляемые в основном у диких водоплавающих птиц.

Вакцинация промышленной домашней птицы против ньюкаслской болезни является причиной регулярного выявления вакциноподобных вирусов. Большинство вакцин против НБ представляют собой лентогенные штаммы ВНБ генотипов I (штаммы V4 и BOR74 субгенотипов I.1.1 и I.1.2.1 соответственно) и II (штаммы LaSota и B1), в то время как некоторые из них представляют собой мезогенные штаммы генотипов II (Роакин, Комаров и Бодетт С) и III (Н). Лентогенные изоляты субгенотипов I.1.1 и I.1.2.1 также выявляли у диких птиц [104]. Что касается вакцинных штаммов II генотипа, то в России распространены штаммы LaSota и B1. Изоляты генотипа II впервые выявили в Северной Америке, а затем были обнаружены в Африке, Азии, Европе и Южной Америке [163, 156, 72, 45]. Вирусы этого генотипа в настоящее время используются в качестве живых вакцин для домашней и промышленной птицы в различных регионах мира [163].

В 2020 году вакцинный штамм генотипа III был обнаружен у домашних кур в Ставропольском крае. Имеющиеся данные о последовательностях изолятов III генотипа позволяют предположить, что все вирусы этого генотипа обладают вирулентными свойствами [163]. Этот генотип включает родственные штаммы Н и Mukteswar, которые являются мезогенными и используются в качестве вакцин в некоторых регионах мира [18, 164].

В 2020-2022 гг в Российской Федерации были обнаружены изоляты ВНБ генотипа I.2. Все изоляты были обнаружены у диких птиц. Этот субгенотип включает авирулентные вирусы, выделенные во многих странах Европы, Азии, Африки и Северной Америки от различных видов диких и домашних водоплавающих птиц, которые являются естественным резервуаром для данной группы вирусов [163]. Ряд таких изолятов также был обнаружен в России [46].

В РФ неоднократно сообщалось об изолятах ВНБ генотипа VIg (согласно классификации Diel 2012 и др.) или генотипа XXI.1.1 (согласно классификации Dimitrov 2019 и др.). Вирусы генотипа VI, иногда называемые голубиным парамиксовирусом типа 1 или RPPMV-1, считаются панзоотическими. Большинство вирусов VI генотипа были выделены преимущественно у птиц семейства голубиные, которое включает различные виды диких и домашних голубей. Вирусы

этого генотипа, по-видимому, распространились по всему миру благодаря торговле спортивными голубями и естественной миграции диких голубей [46, 163]. Различные варианты ВНБ VI генотипа и их производных постоянно циркулируют в России [15, 46, 137].

В 2019 году в Краснодарском крае был обнаружен изолят ВНБ субгенотипа VII.1.1 (субгенотипа VII-L согласно классификации Diel 2012 и др.), который стал причиной крупномасштабной вспышки НБ в период 2019-2023 гг. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей выявленных изолятов показал, что группа иранских изолятов (Esmaelizad 2017 и др., Mayahi 2017 и др., Sabouri 2018 и др.) [7, 8, 34], относящихся к субгенотипу VII.1.1 (VII-L), была наиболее тесно связана с российскими изолятами, полученными в период 2019-2023 гг. Быстрое распространение ВНБ субгенотипа VII.1.1 по территории РФ в 2019 году указывает на то, что основным переносчиком вируса вероятно являются птицы. Однако, в ходе нашей работы вирулентные изоляты ВНБ у диких птиц выявлены не были, что противоречит этой гипотезе. Тем не менее, в литературе имеются данные о случаях выявления вирусов субгенотипа VII.1.1 у диких птиц. Так, ВНБ был выявлен у диких птиц в Турции [79]: у обыкновенной куропатки, утки-кряквы, маленьких сов (Little_Owl/1/Istanbul/TR/2018 и Little_owl/2/Istanbul/TR/2018), и в пробе от пустельги (Common_kestrel/Istanbul/TR/2018). Вирусы субгенотипа VII.1.1 были также обнаружены у белых цапель и домовых воробьев в Египте во время вспышек в период с 2017 по 2019 гг. [108]. В 2018 году на территории Республики Дагестан у дикого фазана также был выявлен вирус субгенотипа VII.1.1 [33]. Однако, согласно результатам предыдущих исследований по выделению вируса, распространенность ВНБ среди водоплавающих птиц, включая уток, составляет от 0,5% до 2,5% [176, 144].

Таким образом, можно выделить основную гипотезу столь массового распространения ВНБ субгенотипа VII.1.1 по территории РФ: распространение вируса только определенными видами птиц, которые включают в себя синантропные виды птиц. Согласно результатам мониторинговых исследований,

проведенных в Казахстане и охватывающих 73 вида птиц [48], вирулентные вирусы были обнаружены только у голубей и у бакланов. Результаты недавнего исследования вспышек НБ в Казахстане, вызванных вирусами субгенотипа VII-b (согласно классификации Diel et al.), показали связь вспышек с миграцией бакланов по территории Центральной Азии [86]. Эти исследования подтверждают роль диких и синантропных птиц в распространении ВНБ среди домашней птицы.

В то же время случаи выявления вакцинных штаммов у диких и синантропных птиц (сапсаны (KU133356.1), орлы (MH996916.1), стервятники (MH996914.1), утки (KU133353.1), лебеди (KT282108.1), голуби (KU200240.1)), в том числе и в данном исследовании, может свидетельствовать о наличии у них иммунитета к ВНБ. По-видимому, постоянный контакт с вакциноподобными и авирулентными вирусами защищает синантропных птиц от массовой гибели при контакте с вирулентными изолятами ВНБ.

Таким образом, результаты данного исследования демонстрируют активную циркуляцию различных штаммов ВНБ на территории РФ и показывают необходимость усиления надзора за синантропными птицами.

3.2 Выделение вирусов на СПФ-КЭ

В ходе научно-исследовательской работы было проведено выделение 41 изолята ВНБ на СПФ-КЭ: 40 изолятов субгенотипа VII.1.1 (VII-L) и 1 изолята субгенотипа XXI.1.1 (VI-g).

Полученные после заражения СПФ-КЭ вирусные суспензии исследовали предварительно в РГА для определения гемагглютинирующей активности. Дифференциацию вируса проводили в РТГА с референтными сыворотками против вируса гриппа птиц (ВГП) подтипов H1-H16 и с референтными сыворотками против ортоавулавируса птиц серотипов 1 (ВНБ), 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9. Результаты тестирования выделенных вирусов методами РГА и РТГА представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты определения типовой специфичности, выделенных изолятов ВНБ методом РТГА

№	Название изолята (субгенотип)	Титр в РГА	Титр в РТГА (сыв. <i>АОАВ-1</i>)
1	2	3	4
1	NDV/Ck/Rus/Krasnodar/207/2019 (VII.1.1)	1:64	1:64
2	NDV/Ck/Rus/Chechnya/819/2019 (VII.1.1)	1:64	1:64
3	NDV/Ck/Rus/Stavropol/923/2019 (VII.1.1)	1:256	1:64
4	NDV/Ck/Rus/Primorsk/1134/2019 (VII.1.1)	1:64	1:64
5	NDV/Ck/Rus/Saratov/2017/2019 (VII.1.1)	1:128	1:64
6	NDV/Ck/Rus/Zabaikalsk/2346/2019 (VII.1.1)	1:64	1:64
7	NDV/Ck/Rus/Omsk/2366/2019 (VII.1.1)	1:64	1:256
8	NDV/poultry/Rus/Kursk/2819/2019 (VII.1.1)	1:128	1:64
9	NDV/Ck/Rus/Primorsk/3087/2019 (VII.1.1)	1:512	1:128
10	NDV/Ck/Rus/Kursk/68/2020 (VII.1.1)	1:64	1:64
11	NDV/Ck/Rus/Kursk/142/2020 (VII.1.1)	1:64	1:64
12	NDV/Ck/Rus/Vladimir/709/2020 (VII.1.1)	1:256	1:64
13	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1464/2020 (VII.1.1)	1:64	1:64
14	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1474/2020 (VII.1.1)	1:128	1:64
15	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1553/2020 (VII.1.1)	1:64	1:64
16	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1715/2020 (VII.1.1)	1:64	1:64
17	NDV/Ck/Rus/Ingushetia/1750/2020 (VII.1.1)	1:128	1:64
18	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1931/2020 (VII.1.1)	1:64	1:256
19	NDV/Ck/Rus/Vladimir/2125/2020 (VII.1.1)	1:64	1:64
20	NDV/Ck/Rus/Chechny/2191/2020 (VII.1.1)	1:64	1:256
21	NDV/Ck/Rus/N.Novgorod/667/2021 (VII.1.1)	1:128	1:64
22	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1035/2021 (VII.1.1)	1:64	1:64
23	NDV/Ck/Rus/Khanty-Mansi/1240/2021 (VII.1.1)	1:128	1:64
24	NDV/Ck/Rus/Primorsk/1472/2021 (VII.1.1)	1:64	1:64
25	NDV/poultry/Rus/Vladimir/2271/2021 (VII.1.1)	1:64	1:64
26	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1114/2022 (VII.1.1)	1:128	1:64
27	NDV/poultry/Rus/Saratov/2403/2022 (VII.1.1)	1:64	1:64
28	NDV/Ck/Rus/Samara/2453/2022 (VII.1.1)	1:64	1:64
29	NDV/poultry/Rus/Bashkortostan/2776/2022 (VII.1.1)	1:128	1:64
30	NDV/quail/Rus/Mari El/128/2023 (VII.1.1)	1:64	1:64

1	2	3	4
31	NDV/Ck/Rus/Samara/761/2023 (VII.1.1)	1:64	1:256
32	NDV/Ck/Rus/N.Novgorod/1230/2023 (VII.1.1)	1:64	1:64
33	NDV/Ck/Rus/Irkutsk/1317/2023 (VII.1.1)	1:64	1:64
34	NDV/Ck/Rus/Vladimir/2042/2023 (VII.1.1)	1:128	1:128
35	NDV/Ck/Mari El/2090/2023 (VII.1.1)	1:64	1:64
36	NDV/Ck/Rus/Khanty-Mansi/2285/2023 (VII.1.1)	1:64	1:64
37	NDV/Ck/Rus/Vladimir/2501/2023 (VII.1.1)	1:64	1:128
38	NDV/Ck/Rus/Vladimir/2546/2023 (VII.1.1)	1:64	1:64
39	NDV/Ck/Rus/Mari El/3061/2023 (VII.1.1)	1:64	1:64
40	NDV/Ck/Rus/Khabarovsk/3162/2023 (VII.1.1)	1:64	1:64
41	NDV/pigeon/Rus/Tatarstan/311/20 (XXI.1.1)	1:64	1:32

В ходе проведения РТГА установили, что гемагглютинирующая активность испытуемых образцов подавлялась только специфической сывороткой к ВНБ, что подтвердило их принадлежность к вирусу ньюкаслской болезни.

Таким образом, в 2019 году были выделены 9 изолятов ВНБ из проб биологического материала домашних птиц, полученных из Краснодарского, Ставропольского, Приморского и Забайкальского краев, Республики Чечня, Саратовской, Омской и Курской областей. Наибольшее значение титра гемагглютинирующей активности показали вирусы из Приморского края (1:512), Ставропольского края (1:256), Саратовской и Курской областей (1:256).

В 2020 году были выделены 11 изолятов ВНБ из проб биологического материала домашних птиц, полученных из Курской и Владимирской областей, Республик Чечня и Ингушетия, и 1 изолят из пробы биологического материала сизого голубя из Республики Татарстан. Наибольшее значение титра гемагглютинирующей активности показали вирусы из Владимирской области и Республики Ингушетия (1:256 и 1:128).

В 2021 году были выделены 5 изолятов ВНБ из проб биологического материала домашних птиц, полученных из Нижегородской и Владимирской областей, Приморского края и Ханты-Мансийского автономного округа.

Наибольшее значение титра гемагглютинирующей активности показали вирусы из Нижегородской области и Ханты-Мансийского автономного округа (1:128).

В 2022 году были выделены 4 изолята ВНБ из проб биологического материала домашних птиц, полученных из Владимирской, Саратовской и Самарской областей и Республики Башкортостан. Наибольшее значение титра гемагглютинирующей активности показали вирусы из Владимирской области и Республики Башкортостан (1:128).

В 2023 году были выделены 11 изолятов ВНБ из проб биологического материала домашних птиц, полученных из Владимирской, Самарской, Нижегородской и Иркутской областей, Республики Марий Эл, Ханты-Мансийского автономного округа и Хабаровского края. Наибольшее значение титра гемагглютинирующей активности показал вирус из Владимирской области (1:128).

Для вирусов с наибольшей гемагглютинирующей активностью в РГА было определено значение титра инфекционной активности по Керберу. Результаты исследований представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Инфекционная активность изолятов ВНБ

Наименование изолята	Титр вируса, lg ЭИД ₅₀ /см ³
NDV/Ck/Rus/Stavropol/923/2019	9,00±0,36
NDV/poultry/Rus/Kursk/2819/2019	8,13±0,27
NDV/Ck/Rus/Primorsk/3087/2019	8,63±0,40
NDV/Ck/Rus/Vladimir/709/2020	8,88±0,37
NDV/Ck/Rus/Ingushetia/1750/2020	9,25±0,32
NDV/Ck/Rus/N.Novgorod/667/2021	9,50±0,38
NDV/Ck/Rus/Khanty-Mansi/1240/2021	8,50±0,41
NDV/poultry/Rus/Bashkortostan/2776/2022	9,63±0,43

Все исследуемые вирусы показали высокий уровень инфекционной активности: более 8 lg ЭИД₅₀/см³.

3.3 Определение полных нуклеотидных последовательностей генов F и HN и нуклеотидных последовательностей полных геномов изолятов вируса ньюкаслской болезни субгенотипа VII.1.1, выявленных в регионах РФ в 2019-2023 гг.

Вирусы субгенотипа VII.1.1 в 2019-2023 гг. выявляли в пробах от домашних птиц из ЛПХ граждан. Стоит отметить, что большая часть вспышек НБ, вызванных вирусами данного субгенотипа, приходится на осенне-зимний период (61,54%). Первый случай выявления вируса НБ субгенотипа VII.1.1 в РФ произошел в январе 2019 года на территории Краснодарского края. Вирус был выявлен в частном секторе в пробах внутренних органов не вакцинированных кур. Затем вирус был вновь выделен в частном секторе в еще двух регионах на юге РФ: в марте в Республике Чечня и в апреле в Ставропольском крае. Неожиданным оказалось выявление вируса НБ субгенотипа VII.1.1 на территории Приморского края в мае. Вирус был выявлен в пробах внутренних органов не вакцинированных кур. Далее вспышки заболевания регистрировали преимущественно в осенне-зимний период с 2019 по 2023 гг. в разных географических точках страны. Регионы РФ, в которых в 2019-2023 гг. выявляли ВНБ субгенотипа VII.1.1, представлены на рисунке 5.

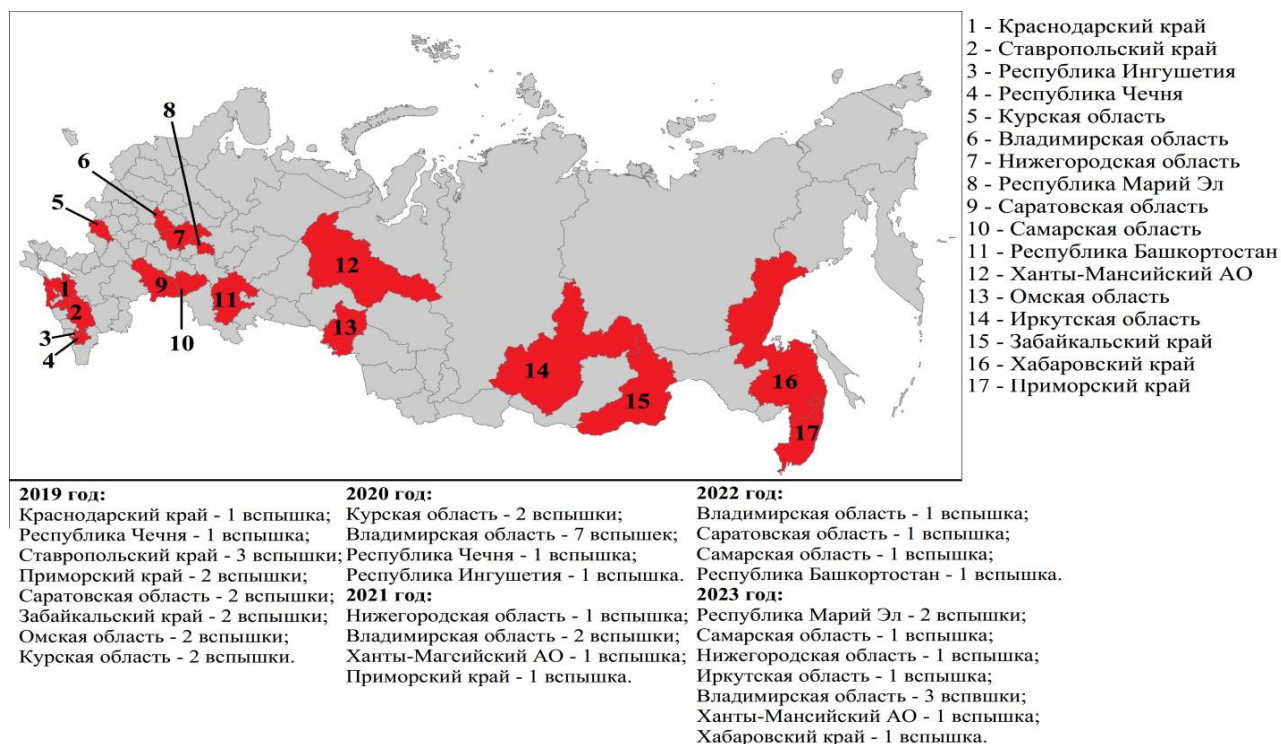


Рисунок 5 - Вспышки НБ на территории РФ в 2019-2023 гг.

В ходе проделанной работы были определены полные нуклеотидные последовательности генов F и HN для 27 изолятов и полногеномные последовательности для 13 изолятов (Таблица 12).

Таблица 12 – Информация о изолятах ВНБ субгенотипа VII.1.1, выявленных на территории РФ в 2019-2023 гг

№	Название изолята	Регион отбора проб	Вид птицы	Дата отбора проб-дата исследования	Результаты секвенирования
1	2	3	4	5	6
1	NDV/Ck/Rus/Krasnodar/207/2019	Краснодарский край	Курица	29.01.19-01.02.19	Полный геном
2	NDV/Ck/Rus/Chechnya/819/2019	Чеченская Респ.	Курица	13.03.19-12.04.19	Полный геном
3	NDV/Ck/Rus/Stavropol/923/2019	Ставропольский край	Курица	18.04.19-23.04.19	Полный геном
4	NDV/Ck/Rus/Primorsk/1134/2019	Приморский край	Курица	06.05.19-22.05.19	F, HN
5	NDV/Ck/Rus/Saratov/2017/2019	Саратовская обл.	Курица	01.08.19-27.08.19	F, HN
6	NDV/Ck/Rus/Zabaikalsk/2346/2019	Забайкальский край	Курица	04.09.19-04.10.19	Полный геном
7	NDV/Ck/Rus/Omsk/2366/2019	Омская обл.	Курица	Нет информации -10.10.19	Полный геном
8	NDV/poultry/Rus/Kursk/2819/2019	Курская обл.	Птица дом.	Нет информации -20.11.19	Полный геном
9	NDV/Ck/Rus/Primorsk/3087/2019	Приморский край	Курица	10.12.19-17.12.19	Полный геном
10	NDV/Ck/Rus/Kursk/68/2020	Курская обл.	Курица	Нет информации -21.01.20	F, HN
11	NDV/Ck/Rus/Kursk/142/2020	Курская обл.	Курица	Нет информации -05.02.20	F, HN
12	NDV/Ck/Rus/Vladimir/709/2020	Владимирская обл.	Курица	30.04.20-07.05.20	F, HN
13	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1464/2020	Владимирская обл.	Курица	04.09.20-24.09.20	F, HN
14	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1474/2020	Владимирская обл.	Курица	07.09.20-15.09.2020	F, HN
15	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1553/2020	Владимирская обл.	Курица	14.09.20-23.09.20	F, HN
16	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1715/2020	Владимирская обл.	Курица	07.10.20-19.10.20	F, HN
17	NDV/Ck/Rus/Ingushetia/1750/2020	Респ. Ингушетия	Курица	13.08.20-15.10.20	Полный геном

1	2	3	4	5	6
18	NDV/Ck/Rus/Vladimir/ 1931/2020	Владимирская обл.	Курица	05.11.20- 16.11.20	F, HN
19	NDV/Ck/Rus/Vladimir/ 2125/2020	Владимирская обл.	Курица	01.12.20- 02.12.20	F, HN
20	NDV/Ck/Rus/Chechny/ 2191/2020	Чеченская респ.	Курица	07.12.20- 11.12.20	F, HN
21	NDV/Ck/Rus/N.Novgorod /667/2021	Нижегородская обл.	Курица	01.05.21- 18.05.21	F, HN
22	NDV/Ck/Rus/Vladimir/ 1035/2021	Владимирская обл.	Курица	20.07.21- 20.07.21	F, HN
23	NDV/Ck/Rus/Khanty- Mansi/1240/2021	Ханты- Мансийский АО	Курица	09.08.21- 23.08.21	Полный геном
24	NDV/Ck/Rus/Primorsk/ 1472/2021	Приморский край	Курица	06.09.21- 27.09.21	F, HN
25	NDV/poultry/Rus/ Vladimir/2271/2021	Владимирская обл.	Птица дом.	28.12.21- 29.12.21	Полный геном
26	NDV/Ck/Rus/Vladimir/ 1114/2022	Владимирская обл.	Курица	08.06.22- 09.06.22	F, HN
27	NDV/poultry/Rus/Saratov/ 2403/2022	Саратовская обл.	Птица дом.	Нет информ.- 29.10.22	F, HN
28	NDV/Ck/Rus/Samara/ 2453/2022	Самарская обл.	Курица	26.10.22- 02.11.22	F, HN
29	NDV/poultry/Rus/Bashkor tostan/2776/2022	Респ. Башкортостан	Птица дом.	05.12.22- 06.12.22	Полный геном
30	NDV/quail/Rus/Mari El/ 128/2023	Респ. Марий Эл	Перепел	25.01.23- 26.01.23	F, HN
31	NDV/Ck/Rus/Samara/ 761/2023	Самарская обл.	Курица	Нет нформ.- 13.04.23	Полный геном
32	NDV/Ck/Rus/N.Novgorod /1230/2023	Нижегородская обл.	Курица	Нет нформ.- 29.05.23	F, HN
33	NDV/Ck/Rus/Irkutsk/ 1317/2023	Иркутская обл.	Курица	24.05.23- 06.06.23	Полный геном
34	NDV/Ck/Rus/Vladimir/ 2042/2023	Владимирская обл.	Курица	15.08.23- 18.08.23	F, HN
35	NDV/Ck/Mari El/ 2090/2023	Респ. Марий Эл	Курица	08.08.23- 24.08.23	F, HN
36	NDV/Ck/Rus/Khanty- Mansi/2285/2023	Ханты- Мансийск. АО	Курица	23.08.23- 13.09.23	F, HN
37	NDV/Ck/Rus/Vladimir/ 2501/2023	Владимирская обл.	Курица	Нет нформ.- 03.10.23	F, HN
38	NDV/Ck/Rus/Vladimir/ 2546/2023	Владимирская обл.	Курица	Нет нформ.- 06.10.23	Полный геном
39	NDV/Ck/Rus/Mari El/ 3061/2023	Респ. Марий Эл	Курица	22.11.23- 23.11.23	F, HN
40	NDV/Ck/ Rus/ Khabarovsk/ 3162/2023	Хабаровский край	Курица	21.11.23- 04.12.23	F, HN

В ходе исследования был проведен анализ полученных полногеномных последовательностей. Длина последовательности для каждого изолята составила 15192 нуклеотида. Сравнение полученных последовательностей с последовательностью изолята, выявленного в Иране в 2011 г (MF417546.1), показало сходство 96,59-98,06%. При сравнении отдельных генов/белков российских изолятов ВБН с иранским было установлено, что ген/белок Р является наиболее вариабельным. Отличия гена Р для разных изолятов составили – 3,5-4,9%, белка Р – 3,6-6,1%. В то же время остальные гены/белки имеют примерно близкие значения нуклеотидных отличий, при заметных различиях изменчивости по аминокислотам (Таблица 13).

Таблица 13 – Отличия генов/белков российских изолятов ВБН субгенотипа VII.1.1 2019-2023 гг. от иранского изолята 2011 г.

Изолят/ год	Ген/белок NP	Ген/белок P	Ген/белок M	Ген/белок F	Ген/белок HN	Ген/белок L
	Процент отличия гена/белка российского изолята от штамма Beh (MF417546.1) (%)					
207/2019	1,8/0,3	3,6/4,4	1,2/1,7	2,0/1,9	1,6/0,9	1,6/0,8
819/2019	2,0/0,7	3,6/4,1	1,1/1,4	1,9/1,7	1,6/1,1	1,6/0,7
923/2019	1,8/0,3	3,5/4,1	1,3/1,7	2,0/1,7	1,6/0,9	1,7/0,8
2346/2019	2,0/0,3	3,6/4,1	1,2/1,4	2,1/1,9	1,6/0,9	1,6/0,6
2366/2019	2,0/0,3	3,7/4,1	1,1/1,4	2,0/1,7	1,6/0,9	1,6/0,6
2819/2019	1,9/0,3	3,6/3,8	1,1/1,4	2,2/1,9	1,6/0,9	1,6/0,6
3087/2019	1,9/0,3	3,7/4,1	1,2/1,4	2,1/1,7	1,6/0,9	1,6/0,6
1750/2020	2,1/0,9	3,6/3,6	1,0/1,1	2,0/1,7	1,9/0,8	1,8/0,8
1240/2021	2,0/0,3	4,0/4,6	1,4/1,7	2,8/2,6	1,7/0,9	1,9/0,7
2271/2021	2,0/0,3	4,5/5,6	1,9/1,4	2,5/2,2	2,5/2,2	2,0/0,7
2276/2022	2,0/0,4	4,9/5,8	2,0/1,6	2,6/2,5	2,6/2,1	2,1/0,7
761/2023	2,1/0,4	4,7/5,8	2,0/1,6	2,4/2,0	2,6/2,1	2,2/0,7
1317/2023	2,0/0,4	4,8/6,1	2,0/1,6	2,5/2,2	2,6/2,1	2,1/0,7
2546/2023	2,6/0,4	4,9/6,1	2,2/1,4	2,6/2,0	2,9/2,1	2,1/0,7

3.4 Филогенетический анализ изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1, выявленных в РФ в 2019-2023 гг.

При исследовании проб были получены полные нуклеотидные последовательности генов F и HN, которые позволили провести сравнительный анализ российских изолятов с вирусами, последовательности которых представлены в базе данных GenBank (ncbi.nlm.nih.gov) (Рисунки 6 и 7).

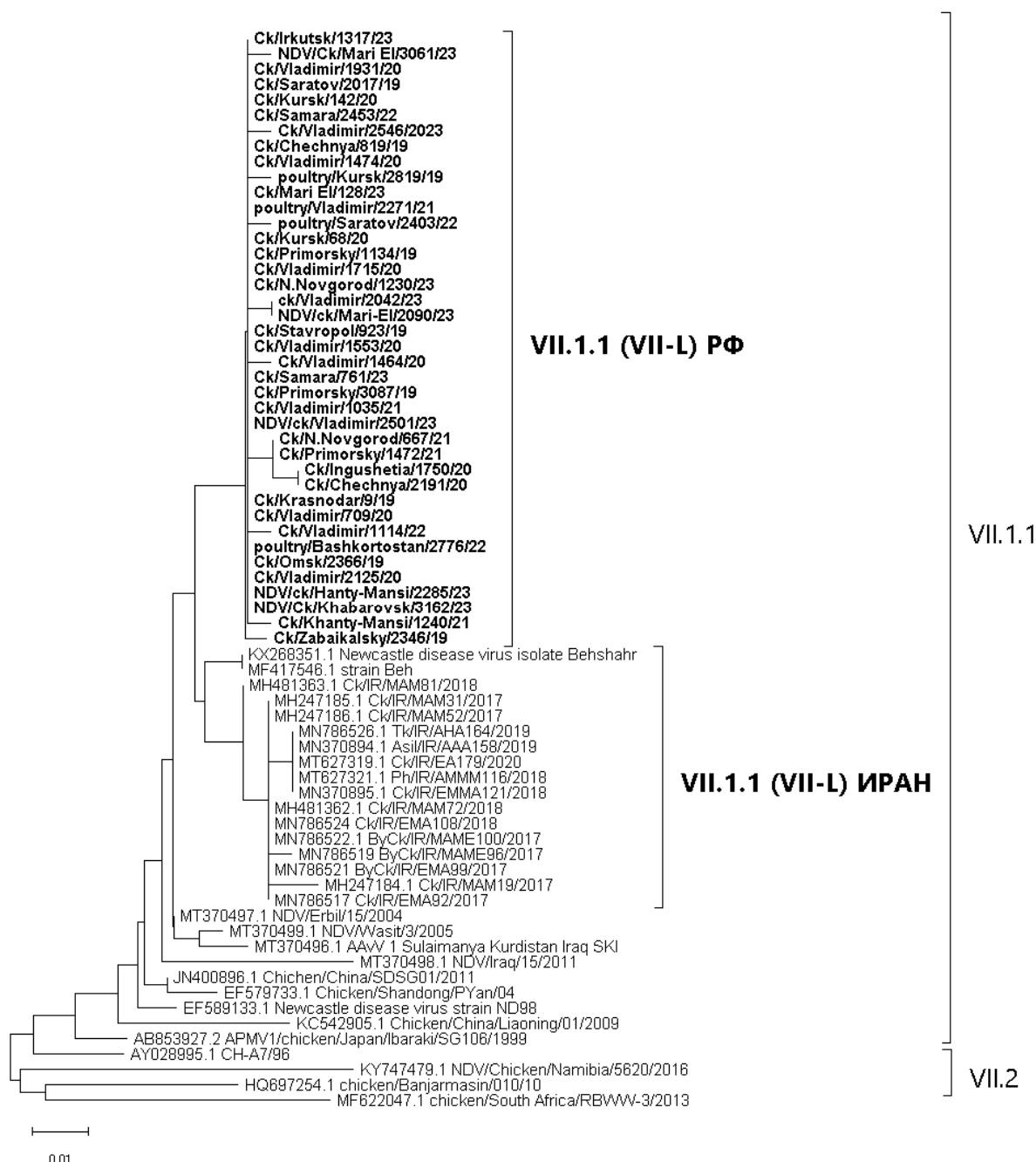


Рисунок 6. Филогенетическое древо изолятов ВНБ генетической группы VII-L (субгенотип VII.1.1) (нуклеотиды 1-1661 ОРС гена F)

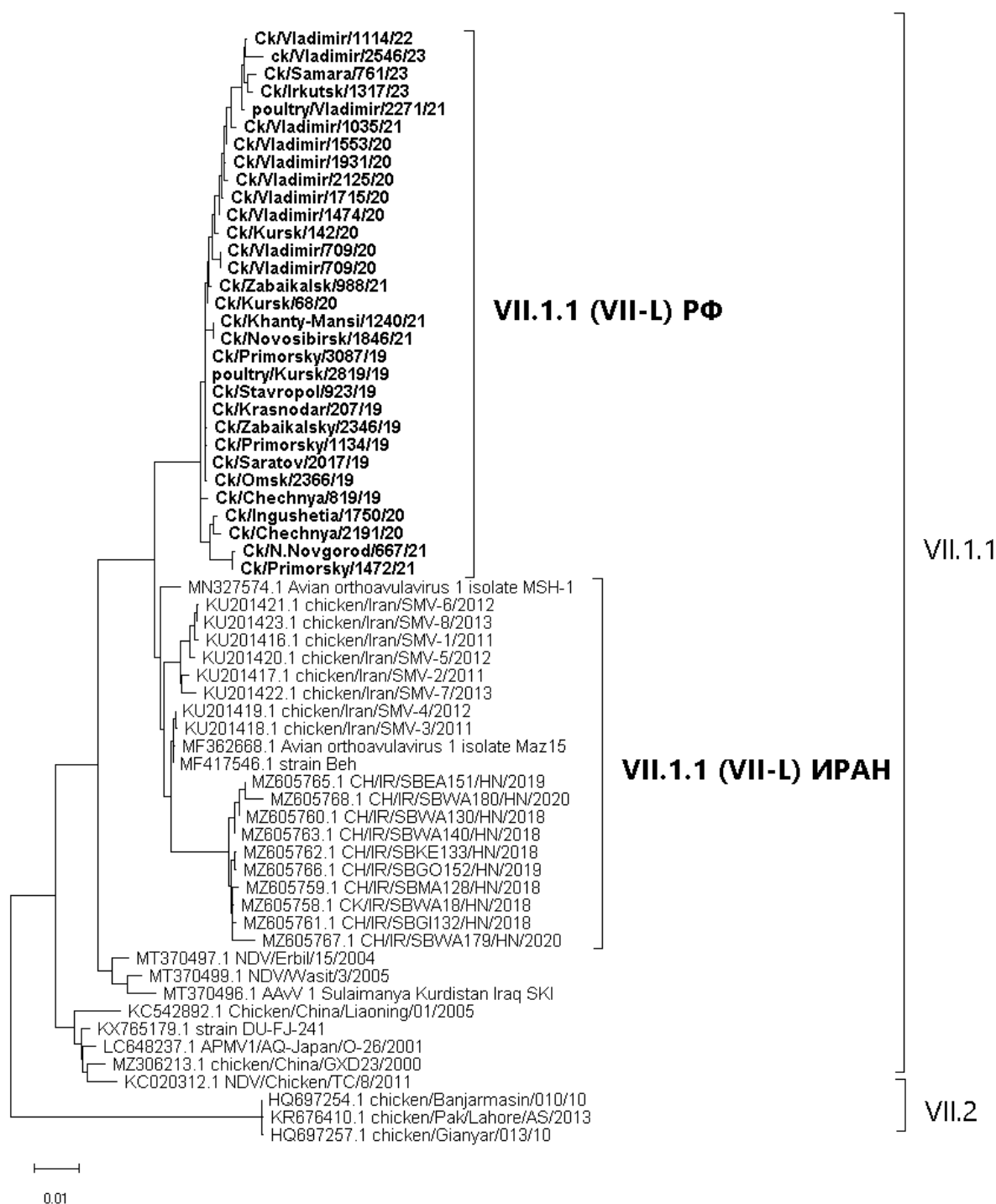


Рисунок 7. Филогенетическое дерево изолятов ВНБ генетической группы VII-L (субгенотип VII.1.1) (нуклеотиды 1-1715 ОРС гена HN)

Поиск обладающих наибольшим сходством последовательностей в программе BLAST показал, что наиболее близкой к российским изолятам 2019-2023 гг является группа изолятов субгенотипа VII-L из Ирана, выявленных в 2011-2015 гг (сходство до 97,95%). Также высокий уровень сходства (96,33-97,05%)

наблюдается с изолятами данного генотипа, выявленными в Иране в 2017-2020 гг. и с изолятами субгенотипа VII-d, выявленными в Ираке в 2005 г. и в 2008 г.

Однако изоляты субгенотипа VII.1.1, выявленные в РФ, обладают рядом специфических нуклеотидных замен, которые определяют их в обособленную генетическую линию в пределах группы VII-L.

Так, на открытой рамке считывания гена F имеются общие для всех изолятов из РФ замены: 114A->T, 152A->G, 210C->T, 294C->T, 348T->C, 441T->C, 474T->C, 480A->G, 504C->T, 564C->A, 651G->A, 748T->C, 810T->C, 834A->G, 906T->C, 948A->G, 1008A->C, 1093C->T, 1131C->G, 1217C->A, 1281A->G, 1401T->C, 1455C->A, 1490G->A, 1497T->C (всего 25 нуклеотидных замен). Большая часть этих замен являются синонимичными транзициями (17 замен), но также присутствуют синонимичные трансверсии (3 замены). В то же время 5 замен из 25 внутри массива российских изолятов являются значимыми: 152A->G (N->S), 564C->A (D->E), 1217C->A (G->S), 1455C->A (N->K), 1490G->A (S->N).

В результате анализа нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания гена HN также были выявлены общие для всех изолятов из РФ замены: 30G->A, 82A->G, 103A->G, 456T->C, 470A->G, 507A->G, 510C->T, 552C->T, 615C->T, 618G->A, 861C->T, 903G->A, 1026C->T, 1066A->G, 1161A->G, 1278A->G, 1450C->T, 1453A->C, 1470G->A, 1490C->A, 1503C->T, 1518C->T, 1530T->C, 1623T->C, 1629T->C, 1684C->T (всего 26 нуклеотидных замен). Большая часть этих замен, как и в случае с F геном, являются синонимичными транзициями (21 замена). Также можно отметить, что 5 замен из 26 являются значимыми: 82A->G (T->A), 103A->G (M->V), 470A->G (Q->R), 1066A->G (K->E), 1490C->A (A->E).

Таким образом, российские изоляты представляют собой монофилетическую группу в рамках субгенотипа VII-L, что указывает на их происхождение от возможно единственного заноса одного из представителей субгенотипа на территорию страны. Также выявленные различия указывают на обособленную эволюцию потенциального предка группы российских изолятов в течение определенного периода времени (вероятно, около 5 лет). Поскольку о ситуации с

ВБН, например, в республиках Закавказья известно немного, такая возможность несомненно существует.

3.5 Эволюционный анализ варибельности нуклеотидных последовательностей изолятов ВНБ, выявленных в РФ в 2019-2023 гг.

В ходе исследования был проведен байесовский анализ полученных последовательностей гена F в программе BEAST с целью определения скорости накопления замен и времени наступления основных филогенетических событий.

Скорость накопления точечных мутаций в группе российских изолятов субгенотипа VII.1.1 (n=40) за пять лет (2019-2023 гг.) была определена в программе BEAST для моделей нуклеотидных замен GTR и НКУ по строгой и некоррелированной мягкой (relaxed) моделей молекулярных часов. Полученные значения скорости накопления нуклеотидных замен практически не зависели от выбранной модели нуклеотидных замен и заметно менялись в зависимости от принятой модели молекулярных часов (0,0018 и 0,002 сайт⁻¹год⁻¹), что наблюдалось и другими авторами для ВНБ [56,116] (Таблица 14).

Таблица 14 - Скорость накопления замен и даты основных филогенетических событий для российских изолятов субгенотипа VII.1.1

Статистики оценок	Использованные модели и оценки параметров			
	GTR		НКУ	
	Строгая модель	Нестрогая модель	Строгая модель	Нестрогая модель
	<i>Скорость накопления замен на сайт в год для изолятов из РФ</i>			
<i>Среднее значение</i>	1.8×10^{-3}	2.0×10^{-3}	1.8×10^{-3}	2.0×10^{-3}
Станд. откл. ср. знач.	3.4310×10^{-4}	5.47×10^{-4}	3.47×10^{-4}	5.50×10^{-4}
	<i>Дата корневого узла дерева для группы иранских и российских изолятов</i>			
<i>Среднее значение</i>	2008.9373	2008.9651	2007.8821	2008.5288
Станд. откл. ср. знач.	1.5625	1.5531	2.935	2.2313
	<i>Дата ближайшего общего предка группы российских изолятов</i>			
<i>Среднее значение</i>	2016.7133	2016.739	2015.7992	2016.4382
Станд. откл. ср. знач.	0.8278	0.8222	1.6926	1.1471

Проведенный анализ выявленных единичных нуклеотидных замен указывает на обособленную эволюцию потенциального предка группы российских изолятов в течение определенного периода времени (вероятно, около 5 лет).

Распространение вируса НБ субгенотипа VII.1.1 по территории РФ в течении одного года оказалось быстрым и не прогнозируемым. В течении 2019 года очаги неблагополучия были зарегистрированы в значительно удаленных друг от друга географических регионах от Кавказа до Дальнего Востока. Первые 3 вспышки заболевания были зарегистрированы в южных регионах страны, далее вирус выявили в дальневосточном регионе, и затем в центральной части страны. При этом сравнение нуклеотидных последовательностей выявленных вирусов свидетельствует об их тесном родстве и происхождении от одного предка. Ранняя точка ветвления российской и иранской группы изолятов, а также отсутствие для первых промежуточных форм указывает на вероятность существования общего предка в неизвестном районе Азии.

Предположение о первоначальном источнике вируса НБ субгенотипа VII.1.1 на территории Ближнего Востока подкрепляется результатами подсчета датировки корневого узла филогенетического древа. Так для нашего набора данных датировка корневого узла дерева показала для разных моделей значения в среднем 2008 – 2009 гг., что ранее первых опубликованных изолятов из Ирана, относящихся к 2010 г, что свидетельствует о раннем отделении будущей «русской» ветви субгенотипа VII.1.1. В то же время дата ближайшего общего предка группы российских изолятов (2016-2017 гг.) довольно близка с датой выявления исследователями из Новосибирска самого раннего из них (*NDV/common pheasant/Dagestan/Russia/33/2018*) в 2018 г., что наряду с филогенетическими данными свидетельствует о практически монофилетическом происхождении группы. Широкое и быстрое распространение вирусов НБ субгенотипа VII.1.1. на территории РФ вызывает ряд вопросов относительно факторов, способствующих распространению вируса на достаточно большие расстояния. Ранее неоднократно обсуждалась причастность перелетных птиц в распространении ВНБ среди домашней птицы [30,56,118].

Список птиц, у которых был выявлен ВНБ генотипа VII, достаточно большой и куры в нем занимают первое место, как наиболее анализируемый объект. Кроме кур, индеек, фазанов и перепелов, в этом списке есть водоплавающие и околоводные птицы (различные виды уток (кряква, мандаринка, пеганка, мускусная утка, чирок-свистунок), гуси, чёрные лебеди, хохлатый ибис, белая цапля), хищные птицы (обыкновенный канюк, ушастая сова, японский перепелятник), а также пингвины, попугаи, павлины и страусы [48,61,128].

ВНБ генотипа VII был выявлен в том числе и у голубей [65,146,148]. Голуби считаются носителями и эффективными переносчиками ВНБ для коммерческих бройлерных цыплят, выращиваемых в открытых птичниках [152]. Тем не менее, нам не удалось выявить вирус генотипа VII у голубей. Выявление и идентификация ВНБ у голубей, проведенная нами в 2019-2023 гг. показали наличие вируса только генотипа XXI (или по более ранней классификации генотипа VI). Однако, доступ к домашней птице в ЛПХ имеют не только голуби. Возможно, необходимо расширить видовой спектр птиц, использующих ЛПХ как кормовую базу, для выявления птиц, участвующих в цепи распространения ВНБ.

Не исключается прямое или опосредованное влияние человека на распространение ВНБ. Роль антропогенного фактора в распространении изолятов ВНБ, связанного с торговлей и грузоперевозками промышленной птицы, подтверждает ряд исследовательских работ из Ирана [110,146]. Определение как человек способствует распространению ВНБ (торговля и/или незаконное перемещение птиц и продуктов из птицы) могло бы существенно снизить экономический урон от заболевания.

3.6 Разработка метода ОТ-ПЦР-РВ для выявления РНК ВНБ генотипа VII и его производных

Разработка метода ОТ-ПЦР-РВ для выявления РНК ВНБ генотипа VII и его производных включала в себя выбор системы праймеров и зонда, обеспечивающих высокую специфичность, эффективность, чувствительность и воспроизводимость реакции.

Выбор праймеров и зонда. В результате анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов изолятов ВНБ, опубликованных в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI [67] до ноября 2020 г. были выбраны и синтезированы 6 праймеров и 6 зондов, фланкирующих разные участки гена L, для последующего их тестирования в ОТ-ПЦР-РВ с целью определения наиболее специфичной и чувствительной системы (таблица 15).

Таблица 15 – Праймеры и зонды для амплификации фрагмента гена L вирусов ВНБ генотипа VII в ОТ-ПЦР-РВ

№	Название праймеров и зондов	Последовательность 5'-3'
1	NDV-VII11771F	GCAGATTATGCCCCGGAACAG
2	NDV-VII11796PF	(FAM)GGTCACCCCTGACAGGGGGC(RTQ1)
3	NDV-VII11796PR	(FAM)GCCCCCTGTCAGGGGTGACC(RTQ1)
4	NDV-VII11843R	TCCACAAGTTCTATGGTATC
5	NDV-VII11681F	ATGCATGCAATGTTGTTCAG
6	NDV-VII11711PF	(FAM)TTCTTATCCAATAGATCCAA(RTQ1)
7	NDV-VII11711PR	(FAM)TTGGATCTATTGGATAAGAA(RTQ1)
8	NDV-VII11772R	TCTGTTCCGGGCATAATCTG
9	NDV-VII10522F	ATCAGGAGTCCCAAATGATG
10	NDV-VII10565PF	(FAM)GGGGGCATTGAGGGGACTCTG(RTQ1)
11	NDV-VII10565PR	(FAM)CAGAGTCCCTCAATGCCCCC(RTQ1)
12	NDV-VII10610R	GCAAGTTGGATTGCAGCAAT

В ходе экспериментальных постановок ОТ-ПЦР-РВ с различными комбинациями праймеров и зондов с выбранными изолятами ВНБ была определена наиболее оптимальная система праймеров и зонд: NDV-VII11681F, NDV-VII11772R, NDV-VII11711PF.

Выбранные праймеры имеют оптимальное соотношение нуклеотидов аденина и тимина (А-Т), а также гуанина и цитозина (G-C).

При адаптации метода ПЦР для выявления изолятов ВНБ генотипа VII и его производных с целью повышения чувствительности, специфичности и скорости анализа были оптимизированы следующие параметры реакции: концентрации компонентов реакционной смеси, температурно-временной режим реакции.

Значение температуры отжига является единственным параметром, непосредственно обусловленным строением олигонуклеотидных праймеров.

Остальные температурные параметры реакции обусловлены компонентами реакционной смеси и общими принципами кинетики реакции.

Для оптимизации температуры отжига праймеров ставили ОТ-ПЦР-РВ по заданной программе амплификации с градиентом температуры отжига от 55°C до 65°C. В результате, оптимальной оказалась температура 60°C. Данная температура отжига праймеров обеспечивает высокую специфичность и чувствительность.

Для оптимизации количества $MgCl_2$, праймеров и зонда в реакционную смесь добавляли разные количества соответствующих компонентов и воды. Затем проводили ОТ-ПЦР-РВ. За оптимальные значения были выбраны следующие концентрации компонентов: раствор $MgCl_2$ – 1,5 mM, растворы прямого и обратного праймера – по 10 пкмоль/мкл, раствор зонда – 10 пкмоль/мкл на 25 мкл реакционной смеси.

В оптимизированном варианте в зависимости от применяемых ферментов (Promega, Thermo Fisher Scientific, Синтол) объемы компонентов реакционной смеси и температурно-временной режим реакции представлены в соответствующем разделе методических рекомендаций по выявлению изолятов *AOAV-1* генотипа VII и его производных с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Определение специфичности реакции. Для оценки специфичности выбранной системы проводили ОТ-ПЦР-РВ, используя пробы с генетическим материалом ВНБ генотипа VII и других генотипов, а также пробы, содержащие РНК вирусов гриппа птиц, инфекционной бурсальной болезни и инфекционного бронхита кур (таблица 16).

Таблица 16 – Изоляты ВНБ, ВГП, ВИББ, ВИБК

№	Название изолята	Подтип вируса*
1	2	3
1	AOAV/ch/Rus/Kemerovo/957/21	ВНБ I.1.1 (Ia)
2	штамм Ulster 2C	ВНБ I.2 (Ib)
3	штамм Lasota	ВНБ II
4	AOAV/ch/Rus/Stavropol/2191/20	ВНБ III
5	штамм H	ВНБ III

1	2	3
6	NDV/Pi/Tver/01	ВНБ VI.2.1.1.1 (VIa)
7	NDV/Pi/Kemerovo/762-2/05	ВНБ VI.1.1 (VIb)
8	NDV/Pi/Donesk/01	ВНБ VI.1.1 (VIb)
9	NDV/Pi/ZKR/02	ВНБ XX (VIc)
10	NDV/Pi/Krasnoyarsk/1550/13	ВНБ XXI.1.1 (VIg)
11	NDV/Pi/Rus/Vladimir/687/05	ВНБ XXI.1.1 (VIg)
12	NDV/Pi/Tatarstan/311/20	ВНБ XXI.1.1 (VIg)
13	NDV/ch/Rus/Leningrad/261/00	ВНБ XIII.1.2 (XIIIa, VIIb)
14	NDV/ch/Kaluga/2000	ВНБ XIII.1.2 (XIIIa, VIIb)
15	NDV/ch/Rus/Amurskaya/237/03	ВНБ VII.1.1 (VIIId)
16	NDV/ch/Rus/Alania/747/05	ВНБ VII.1.1 (VIIId)
17	NDV/ch/Kaliningrad/200/13	ВНБ VII.2 (VIIh)
18	NDV/ch/Kaliningrad/184/13	ВНБ VII.2 (VIIh)
19	NDV/ch/Rus/Crimea/54/17	ВНБ VII.2.1 (VIIi)
20	NDV/ch/Krasnodar/9/19	ВНБ VII.1.1 (VIIl)
21	NDV/ch/Novgorod/667/21	ВНБ VII.1.1 (VIIl)
22	NDV/ch/Vladimir/709/20	ВНБ VII.1.1 (VIIl)
23	A/ch/Kostroma/3175/17 H5N2	ВГП
24	штамм «БГ»	ВИББ
25	штамм «Н-120»	ВИБК

В ходе эксперимента положительные результаты были получены только в пробах, содержащих РНК ВНБ генотипа VII и его производных.

Определение эффективности реакции. В ходе данной работы была определена эффективность реакции (Е) для разных субгенотипов ВНБ генотипа VII и его производных. Непосредственно перед выполнением эксперимента готовили ряд десятикратных разведений (10^{-1} - 10^{-7}) выделенной РНК изолятов NDV/ck/Vladimir/709/20 – VII.1.1 (VIIl), NDV/ck/Rus/Crimea/54/17 – VII.2.1 (VIIi), NDV/ck/Kaliningrad/184/13 – VII.2 (VIIh), NDV/ck/Rus/Amurskaya/237/03 – VII.1.1 (VIIId), NDV/ck/Rus/Leningrad/261/00 – XIII.1.2 (XIIIa). Для определения эффективности реакции ставили ОТ-ПЦР-РВ с разведениями 10^{-3} - 10^{-7} . Каждое разведение ставили в трёх повторностях. Значения Е составили от 90% до 93% у разных субгенотипов, что является приемлемым для данного метода. Значения m , R^2 , b и Е для исследуемых изолятов представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Значения коэффициента детерминации, наклона прямой и эффективности реакции для изолятов ВНБ генотипа VII и его производных разных субгенотипов

Название изолята и субгенотип	Наклон прямой (m)	Коэффициент детерминации (R^2)	Эффективность реакции (E)	Точка пересечения прямой с осью y, b
NDV/ck/Rus/Leningrad/261/00 – XIII.1.2 (XIIIa, VIIb)	-3,59	0,9855	0,90 (90%)	46,426
NDV/ck/Rus/Amurskaya/237/03 – VII.1.1 (VIIId)	-3,56	0,9751	0,91 (91%)	49,891
NDV/ck/Rus/Crimea/54/17 – VII.2.1 (VIIi)	-3,51	0,9788	0,93 (93%)	46,046
NDV/ck/Kaliningrad/184/13 – VII.2 (VIIh)	-3,55	0,9925	0,91 (91%)	42,871
NDV/ck/Vladimir/709/20 – VII.1.1 (VIIIL)	-3,54	0,9961	0,92 (92%)	45,883

Определение аналитической чувствительности и воспроизводимости реакции. Непосредственно перед выполнением эксперимента готовили ряд десятикратных разведений (10^{-1} - 10^{-8}) выделенной суммарной РНК следующих изолятов: NDV/ck/Vladimir/709/20 – VII.1.1 (VIIIL), NDV/ck/Rus/Crimea/54/17 – VII.2.1 (VIIi), NDV/ck/Kaliningrad/184/13 – VII.2 (VIIh), NDV/ck/Rus/Amurskaya/237/03 – VII.1.1 (VIIId), NDV/ck/Rus/Leningrad/261/00 – XIII.1.2 (XIIIa). Для определения чувствительности реакции ставили ОТ-ПЦР-РВ с разведениями 10^{-3} - 10^{-6} . Каждое разведение исследовали в трёх повторностях. Значение порогового цикла (C_t), выше которого результаты реакции следует считать отрицательными, установили на уровне 37. Оценку чувствительности для граничного значения порогового цикла ($C_t = 37,00$) в ОТ-ПЦР-РВ проводили с помощью уравнения для стандартной прямой. Как видно из таблицы 18, данный метод ОТ-ПЦР-РВ способен обнаружить РНК вирусов ВНБ VII генотипа и его производных при значениях инфекционного титра от 1,65 до 3,62 lg ЭИД₅₀/см³. Полученные результаты по аналитической чувствительности сопоставимы с ранее разработанным методом ОТ-ПЦР-РВ с амплификацией фрагмента гена L [51] и являются приемлемыми.

Таблица 18 – Значения порогового цикла для изолятов ВНБ VII генотипа и его производных в ОТ-ПЦР-РВ и граничные значения чувствительности

Название изолята и генотип	Значение инфекционного титра, lg ЭИД ₅₀ /см ³	Среднее значение Ct для разведения				Кол-во lg ЭИД ₅₀ /см ³ для Ct = 37,00
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
NDV/ch/Kaliningrad/184/13 – VII.2 (VIIh)	7,9	25,41±0,133	29,15±0,078	32,61±0,116	36,08±0,431	1,65
NDV/ch/Rus/Crimea/54/17 – VII.2.1 (VIIi)	8,6	26,24±0,106	30,13±0,019	33,38±0,143	36,85±0,770	2,58
NDV/ch/Vladimir/709/20 – VII.1.1 (VIIIL)	9,0	24,43±0,057	28,62±0,252	31,50±0,090	35,30±0,640	2,51
NDV/ch/Rus/Leningrad/261/00 – XIII.1.2 (XIIIa)	9,0	24,20±0,082	29,00±0,149	32,29±0,142	35,60±0,543	2,63
NDV/ch/Rus/Amurskaya/237/03 – VII.1.1 (VIIId)	9,5	26,52±0,105	30,48±0,012	34,22±0,551	37,14±0,394	3,62

Воспроизводимость данного метода была подтверждена в ходе постановок ОТ-ПЦР-РВ с десятикратными разведениями (10⁻³-10⁻⁶) изолятов ВНБ VII генотипа и его производных в трёх повторностях в три разных дня. Как видно из таблицы 19, средние значения порогового цикла в ОТ-ПЦР-РВ показали высокую воспроизводимость разработанного метода.

Таблица 19 – Значения порогового цикла для изолятов ВНБ VII генотипа и его производных при трёх постановках ОТ-ПЦР-РВ в разные дни

Название изолята и генотип	Среднее значение Ct для разведения			
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
NDV/ck/Kaliningrad/184/13 – VII.2 (VIIh)	26,82±0,384	29,59±0,186	33,21±0,231	36,64±0,279
NDV/ck/Rus/Crimea/54/17 – VII.2.1 (VIIi)	27,55±0,411	30,47±0,169	33,93±0,242	37,02±0,554
NDV/ck/Vladimir/709/20 – VII.1.1 (VIIIL)	24,51±0,201	27,95±0,175	31,18±0,219	35,31±0,362
NDV/ck/Rus/Leningrad/261/00 – XIII.1.2 (XIIIa)	24,09±0,117	31,34±0,416	32,99±0,380	36,16±0,445
NDV/ck/Rus/Amurskaya/237/03 – VII.1.1 (VIIId)	25,76±0,693	28,86±0,566	33,46±0,352	36,30±0,372

Таким образом, в результате проведенной работы была подобрана праймерная система и зонд для выявления РНК генома ВНБ VII генотипа и его

производных в ОТ-ПЦР-РВ. Данный метод характеризуется высокими значениями специфичности, эффективности (от 90% до 93% для разных субгенотипов), чувствительности (от 1,65 до 3,62 lg ЭИД₅₀/см³ для разных субгенотипов) и воспроизводимости реакции.

С помощью предложенного метода возможно выявлять РНК ВНБ VII генотипа и его производных в пробах биологического материала птиц.

3.7 Разработка метода определения первичной структуры генов F и HN изолятов вируса ньюкаслской болезни генотипа VI с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования

Для разработки и применения в молекулярной лабораторной диагностике метода определения первичной структуры генов F и HN изолятов ВНБ генотипа VI с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования было необходимо выполнить несколько этапов работы: осуществить выбор и выравнивание полных нуклеотидных последовательностей генов F и HN, опубликованных в международной базе GenBank электронного ресурса NCBI; провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов F и HN изолятов ВНБ генотипа VI и осуществить подбор олигонуклеотидных праймеров для эффективной амплификации фрагментов генов F и HN необходимой длины и последующего секвенирования; выбрать оптимальные температурно-временные параметры ОТ-ПЦР для обеспечения необходимой чувствительности реакции; продемонстрировать возможность применения разработанного метода для определения первичной структуры генов F и HN исследуемых изолятов ВНБ генотипа VI.

Подбор праймеров является ключевым звеном в разработке нового метода ОТ-ПЦР, поскольку именно ими определяется возможность амплификации нужной последовательности. Системой праймеров обусловлены ключевые характеристики реакции: чувствительность и специфичность.

В нашем случае предполагалось использовать несколько пар праймеров с возможностью создания различных комбинаций с целью амплификации

нескольких фрагментов генов F и HN ВНБ генотипа VI. В качестве биологического материала исследования в основном предполагается использовать аллантоисную жидкость СПФ-КЭ. Однако не исключается и использование суспензий биологического материала, в случае невозможности выделения вируса. В случае использования аллантоисной жидкости даже некоторое возможное неполное соответствие структуры праймера и соответствующего участка, на который он был выбран, гораздо меньше повлияет на его амплификацию. Объяснить это можно тем, что при использовании более концентрированного и качественного генетического материала повышается вероятность взаимодействия ДНК-матрицы и праймеров в реакционной смеси.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей изолятов ВНБ генотипа VI, опубликованных в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI [67], были выбраны необходимые для амплификации и последующего секвенирования фрагменты генов F и HN. В выборке использовали нуклеотидные последовательности вируса НБ, преимущественно выделенных в странах Азии, Европы и Африки. Методом сравнительного анализа последовательностей определили консервативные участки, фланкирующие выбранные фрагменты генов F и HN, и осуществили дизайн олигонуклеотидных праймеров, таким образом, чтобы они были максимально идентичны консервативным участкам.

В результате проведенной работы было выбрано 35 праймеров. Их структуры указаны в таблице 20.

Таблица 20 – Структура праймеров для амплификации и определения первичной структуры генов F и HN ВНБ генотипа VI

№	Название	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
1	2	3
1	FVI-210f	AAG-ATA-GAG-AAG-ARG-CAC-AC
2	FVI-58f	ATT-AGG-AAA-AAC-ACG-GGT-AG
3	FVI118f	GCG-GGG-ATT-GTG-GTA-ACA-GG
4	FVI243f	AGA-GGC-ATA-CAA-CAG-AAC-AC
5	FVI374r	TGT-YGC-RAC-CCC-AAG-AGC-TA
6	FVI424r	GCA-TTC-TGG-TTR-GCT-TGT-AT
7	FVI510f	CGG-ATT-ATC-RCA-ACT-AGC-AG
8	FVI586r	ATT-TTT-ATR-CAG-TCC-AAT-TC
9	FVI608r	TTC-TAY-RCC-GAC-TTG-TTG-TG
10	FVI820f	AYT-GTA-TGA-CTC-ACA-GAC-TC
11	FVI882r	TGG-CAC-GCA-TAT-TRT-TAA-GG

1	2	3
12	FVII107f	TTG-CAT-GTA-YTC-AAA-GAC-TG
13	FVII1221r	CYC-CAT-AGT-TTT-GYG-ATA-TG
14	FVII1264r	GAT-AAG-ACA-TTG-CAT-GAA-TG
15	FVII1358f	CTC-AAG-TCA-TCG-TGA-CRG-GC
16	FVII1740r	TTA-TAT-CYA-GTA-RTT-TTT-TC
17	FVII1778r	TCY-CCR-ACC-GTT-CTA-CCC-GT
18	HNVI1624f	AAY-ACC-CTC-GAT-CAR-ATG-AG
19	HNVI1944r	ARA-AGT-AAA-ACT-GCR-ATC-CG
20	HNVI1769f	ARG-CAA-TRC-ACG-GGT-AGA-AC
21	HNVI2136r	AGT-GCC-ARC-GGA-RAT-TCA-AG
22	HNVI2088f	CTC-AGT-TCR-AAY-CAA-GAT-GT
23	HNVI2418r	TTR-TGA-GTA-TAA-CAR-TAG-TG
24	HNVI2361f	GCG-CCY-ACY-ACA-GGA-TCA-GG
25	HNVI2678r	AAC-CTA-AYC-TTC-CRT-GCA-CC
26	HNVI2574f	AAR-TCY-TGC-AGT-GTG-AGT-GC
27	HNVI2927r	TGT-AYG-AAG-AYT-TAG-CCA-TC
28	HNVI2865f	AAA-TAT-GTR-ATA-TAY-AAG-CG
29	HNVI3228r	CTT-GCT-GAT-GCC-TGA-CAA-GG
30	HNVI3136f	CTG-CCT-TAT-TAT-AYC-CYA-TG
31	HNVI3468r	AYT-TTA-TTR-GTC-TTG-ACA-AC
32	HNVI3326f	GGT-MTT-CGG-RAC-AAT-GCT-TG
33	HNVI3389f	CAA-CAT-ATC-YCG-CAG-YCG-TG
34	HNVI3833r	GCY-YGC-CAT-TTC-CTA-CCC-GT
35	HNVI3898r	ACT-AAT-GGR-GAR-GAT-AGA-TG

Все выбранные праймеры имеют длину 20 н.о. и достаточно оптимальное соотношение нуклеотидов аденина и тимина (А-Т), а также гуанина и цитозина (G-С). Изначально предполагалось, что для всех праймеров температура отжига будет составлять примерно 55°C, в связи с этим и подбиралась структура каждого праймера. Данный подход обусловлен тем, что оптимально проводить реакцию в одном амплификаторе, а температура отжига праймеров является наиболее критичным параметром.

Для амплификации фрагментов генов F и HN в ОТ-ПЦР использовали пары праймеров, указанные в таблице 21. Прямой праймер маркирован буквой F, обратный – R. В скобках указаны праймеры, которые могут быть использованы дополнительно для секвенирования фрагментов генов F и HN изолятов ВНБ генотипа VI. Для секвенирования с помощью оригинальной системы праймеров получают десять фрагментов кДНК, полностью перекрывающих последовательность генов F и HN.

Таблица 21 – Олигонуклеотидные пары праймеров, используемые для амплификации фрагментов генов F и HN изолятов ВНБ в ПЦР

№ фрагмента	Пары праймеров для ПЦР (праймеры для секвенирования)	Длина фрагмента н.п.
1	FVI-58f–FVI374r (FVI118f)	432
2	FVI243f– FVI608r (FVI424r, FVI510f, FVI586r)	365
3	FVI510f– FVI882r	372
4	FVI820f– FVI1264r (FVI1107f, FVI1221r, FVI2361f)	444
5	FVI1107f– FVI1740r (FVI1358f)	633
6	HNVI1624f-HNVI2136r (HNVI1769f, HNVI1944r)	512
7	HNVI2088f-HNVI2678r (HNVI2418r, HNVI2574f)	590
8	HNVI2574f-HNVI2927r	353
9	HNVI2865f-HNVI3468r (HNVI3136f)	603
10	HNVI3326f-HNVI3898r (FHNVI3228r, HNVI3389f, HNVI3833r)	572

Выявление генома ВНБ генотипа VI в пробах ЭЭЖ СПФ-КЭ и последующее определение нуклеотидных последовательностей включает четыре этапа: выделение суммарной РНК из вируссодержащего материала, амплификацию фрагментов генов F и HN с помощью реакций обратной транскрипции и ПЦР, детекцию ампликонов методом электрофореза, нуклеотидное секвенирование.

В качестве исходного материала для выделения суммарной РНК использовали изоляты ВНБ генотипа VI, выделенные на территории РФ в 2015-2020 гг. (таблица 22).

Таблица 22 – Изоляты ВНБ гепотипа VI, используемые для определения валидационных характеристик

№	Название изолята	Год выявления	Вид птицы
3	NDV/Pi/Rus/Chechnya/219/15	2015	голубь
4	NDV/Pi/Rus/Kostroma/3606/17	2017	голубь
5	NDV/Pi/Rus/Vladimir/1211/19	2019	голубь
6	NDV/Pi/Tatarstan/311/20	2020	голубь

Инфекционный агент выделяли из 0,1 мл биологического материала при помощи набора, предназначенного для экстракции РНК, согласно инструкции

производителя. При адаптации метода ПЦР для определения первичной структуры генов F и HN изолятов ВНБ генотипа VI с целью повышения чувствительности, специфичности и скорости анализа были оптимизированы следующие параметры реакции: концентрации компонентов реакционной смеси, температурно-временной режим реакции.

Поскольку одним из условий разработки метода была постановка реакции амплификации одновременно с несколькими фрагментами генов F и HN в одном амплификаторе, то оптимальной оказалась «средняя» температура отжига для подобранных пар праймеров – 55°C. В результате было показано, что все десять фрагментов (таблица 21) длиной от 353 до 633 п.н. нарабатывались одинаково эффективно при заданном температурном режиме (рисунок 8).

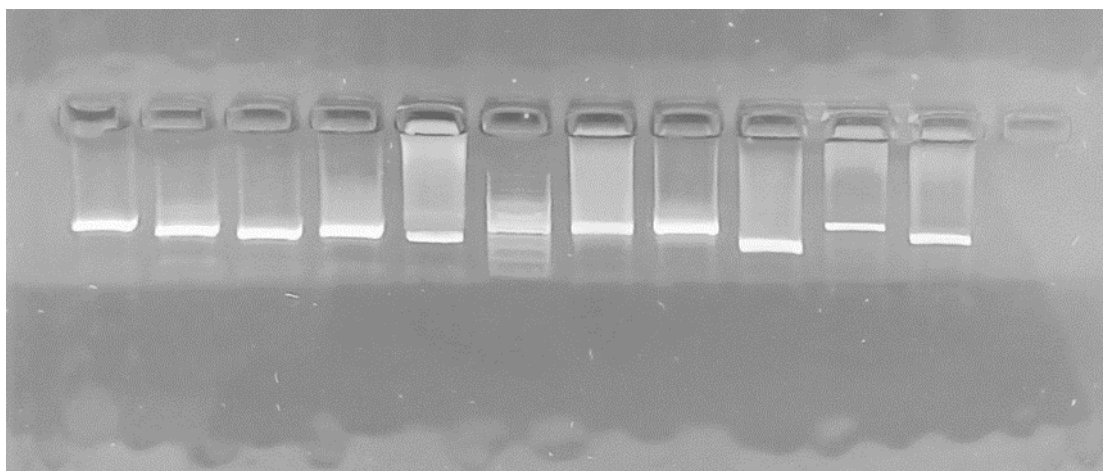


Рисунок 8. Электрофореграмма полученных продуктов ПЦР для десяти пар праймеров, используемых для амплификации фрагментов генов F и HN изолятов ВНБ при температуре отжига 55°C

Для оптимизации количества $MgCl_2$ и праймеров в реакционную смесь добавляли разные количества соответствующих компонентов и воды. Затем проводили ОТ-ПЦР. За оптимальные значения были выбраны следующие концентрации компонентов: раствор $MgCl_2$ – 25 mM, растворы прямого и обратного праймера – по 10 пкмоль/мкл на 25 мкл реакционной смеси.

В оптимизированном варианте в зависимости от применяемых ферментов (Promega, Thermo Fisher Scientific) объемы компонентов реакционной смеси и температурно-временной режим реакции представлены в соответствующем разделе методических рекомендаций по определению первичной структуры генов

F и HN изолятов вируса НБ генотипа VI с помощью реакции обратной транскрипции, ПЦР и нуклеотидного секвенирования.

Описание проведения учета результатов ПЦР и очистки продуктов амплификации представлено в соответствующем разделе методических рекомендаций.

Для оценки специфичности разработанного метода проводили ОТ-ПЦР, используя пробы с генетическим материалом ВНБ генотипов I, II, III, VII, VI а также пробы, содержащие РНК вирусов гриппа птиц, инфекционной бурсальной болезни и инфекционного бронхита кур (таблица 23).

Таблица 23 – Изоляты ВНБ разных генотипов, ИББ, ИБК, ВГП, применяемые для определения специфичности реакции

№	Название изолята/штамма	Подтип вируса
1	препарат вакцинного шт. «LaSota»	ВНБ генотипа II
2	препарат вакцинного шт. «Бор-74»	ВНБ генотипа I
3	AOAV/ch/Rus/Stavropol/2191/20	ВНБ генотипа III
4	NDV/ch/Vladimir/709/20	ВНБ генотипа VII
5	NDV/Pi/Rus/Chechnya/219/15	ВНБ генотипа VI
6	NDV/Pi/Rus/Kostroma/3606/17	ВНБ генотипа VI
7	NDV/Pi/Rus/Vladimir/1211/19	ВНБ генотипа VI
8	NDV/Pi/Tatarstan/311/20	ВНБ генотипа VI
9	препарат вакцинного шт. «Winterfield 2512»	Вирус инфекционной бурсальной болезни
10	препарат вакцинного шт. «H120»	Вирус инфекционного бронхита кур
11	A/ch/Kostroma/3175/17 H5N2	вирус гриппа птиц А

В результате экспериментальных постановок в ОТ-ПЦР положительный результат получен только в пробах, содержащих РНК изолятов ВНБ генотипа VI.

На основе представленного метода разработаны методические рекомендации по определению первичной структуры генов F и HN изолятов вируса ньюкаслской болезни генотипа VI с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования, которые применяются в референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ».

С применением вышеизложенных методических рекомендаций достоверно определена первичная структура генов F и HN трех изолятов вируса ньюкаслской болезни.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 Выводы

1. В 2019-2023 гг. на территории РФ выявляли следующие генетические группы ВНБ: вирулентные вирусы генотипа VII, выявляемые у домашних птиц в ЛПХ граждан; вирулентные изоляты генотипа VI и его производные, циркулирующие в популяциях голубей; лентогенные и реже мезогенные вакцинные штаммы генотипов I, II и III; авирулентные вирусы генотипа I класса II, выявляемые в основном у диких водоплавающих птиц, что свидетельствует о широком распространении вирулентных и авирулентных ВНБ в России.

2. Сравнение последовательностей полных геномов изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1, выявленных в РФ в 2019-2023 гг., с последовательностью изолята, выявленного в Иране в 2011 г. (MF417546.1), показало сходство 96,59-98,06%. При сравнении отдельных генов/белков российских изолятов ВНБ с иранским было установлено, что самым вариабельным является ген/белок Р. Отличия гена Р для разных изолятов составили – 3,5-4,9%, белка Р – 3,6-6,1%.

3. Российские изоляты генотипа VII.1.1 представляют собой монофилетическую группу в рамках субгенотипа VII-L, что указывает на их происхождение от возможно единственного заноса одного из представителей субгенотипа на территорию страны.

4. Датировка корневого узла дерева для групп российских и иранских изолятов субгенотипа VII.1.1 (VII-L) показала значения в среднем 2008-2009 гг., что свидетельствует о раннем отделении будущей «российской» ветви субгенотипа VII.1.1 (VII-L). В то же время дата ближайшего общего предка группы российских изолятов (2016-2017 гг.) близка с датой выявления самого раннего из них (2019 г.), что наряду с филогенетическими данными свидетельствует о практически монофилетическом происхождении группы.

5. Разработан метод по выявлению РНК ВНБ генотипа VII с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени в пробах биологического материала птиц. Разработанный метод характеризуется высокими значениями специфичности,

эффективности (от 90% до 93% для разных субгенотипов), чувствительности (от 1,65 до 3,62 lg ЭИД₅₀/см³ для разных субгенотипов) и воспроизводимости реакции. С помощью предложенного метода возможно выявлять РНК ВНБ VII генотипа и его производных в пробах биологического материала от птиц.

6. Разработан метод, позволяющий определять первичную структуру генов F и HN изолятов вируса ньюкаслской болезни генотипа VI и его производных с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования. С применением разработанного метода достоверно определена первичная структура генов F и HN трех изолятов вируса ньюкаслской болезни генотипа VI.

7. Определены гемагглютинирующая активность и значения титра инфекционной активности некоторых изолятов ВНБ. Все исследуемые вирусы вызывали гибель СПФ-КЭ в течении 72 ч и показали высокий уровень инфекционной активности при заражении СПФ-КЭ: более 8 lg ЭИД₅₀/см³. Штаммы использовались при разработке методических рекомендаций для диагностики ВНБ методами ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ и пригодны для дальнейшего применения в качестве стандартных образцов при совершенствовании средств и методов лабораторной диагностики инфекции.

4.2 Практические предложения

В результате проведённых исследований предложено 10 новых штаммов ВНБ, депонированных в ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ, в качестве стандартных образцов при разработке методических рекомендаций, а также при контроле диагностических препаратов.

Разработаны и внедрены в лабораторную практику «Методические рекомендации по выявлению РНК изолятов Avian orthoavulavirus 1 генотипа VII и его производных с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени»; «Методические рекомендации по определению первичной структуры генов F и HN изолятов вируса ньюкаслской болезни генотипа VI с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования»; «Методические рекомендации по определению

последовательности ДНК с помощью реакции секвенирования на генетическом анализаторе НАНОФОР-05».

Получен патент на изобретение №2821028 «Штамм “ВНИИЗЖ G7” вируса ньюкаслской болезни птиц для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц».

4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Эволюция возбудителя и его разнообразие штаммов потребует дальнейших исследований по изучению их биологических свойств, разработку аналогичных методов и средств лабораторной диагностики.

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологические свойства велогенных штаммов вируса болезни Ньюкасла, изолированных от птиц на Северном Кавказе / Н. Ю. Силко, А. В. Глущенко, Л. В. Шестопалова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – № 1. – С. 45-48.

2. Биологические свойства изолятов вируса ньюкаслской болезни, выделенных у голубей в Курской области / П. И. Репин, И. А. Чвала, И. П. Пчелкина [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2013. – № 93. – Р. 157-166.

3. Вирус болезни Ньюкасла в популяциях диких птиц на территории юга Приморского края в период осенних миграций 2001-2004 гг. / М. Ю. Щелканов, Е. В. Усачев, И. Т. Федякина [и др.] // Вопросы вирусологии – 2006. – Т. 51. – № 4. – С. 37-41.

4. Выявление на территории РФ вирулентных изолятов вируса болезни Ньюкасла генотипа VII-L / Н. Г. Зиняков, А. В. Андриясов, Е. В. Овчинникова [и др.] // Сборник трудов X юбилейной международной научно-практической конференции Молекулярная диагностика. – Москва: ООО «Юлис», 2021. – Т. 2. – С. 324-325.

5. Генетический анализ изолятов вируса ньюкаслской болезни, выявленных в Республике Крым в 2016-2017 гг. / Е. В. Шагурина, С. Н. Колосов, А. В. Андриясов, И. А. Чвала // Сборник научных докладов XX Международной научно-практической конференции. Аграрная наука - сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии, Казахстана, Беларуси и Болгарии. - Новосибирск: Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, 2017. – Т. 2. - С. 48-50.

6. Изоляция вирусов гриппа А (*Orthomyxoviridae, Influenza A Virus*), Дхори (*Orthomyxoviridae, Thogotovirus*) и болезни Ньюкасла (*Paramyxoviridae, Avulavirus*) на острове Малый жемчужный в северо-западной части акватории Каспийского моря / К. Б. Яшкулов, М. Ю. Щканов, С. С. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2008. – Т. 53. – № 3. – Р. 34-38.

7. Киур-Муратов, А. П. О чуме птиц / А. П. Киур-Муратов. – 1944. – № 11-12. – С. 28-31.

8. Комплексный эколого-вирусологический мониторинг на территории Приморского края в 2003-2006 гг. / М. Ю. Щелканов, В. Ю. Ананьев, Д. Н. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2007. – Т. 52. – № 5. – С. 37-48.

9. Молекулярно-вирусологический мониторинг вируса болезни Ньюкасла (*Paramyxoviridae, Avulavirus*) в популяциях диких птиц дельты Волги (данные 2001 г.) / Е. В. Усачев, М. Ю. Щелканов, И. Т. Федякина [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2006. – Т. 51. – № 5. – С. 32-38.

10. Молекулярно-генетическая характеристика везикулярных изолятов вируса болезни Ньюкасла, выделенных на территории Российской Федерации, Украины, Казахстана и Киргизии / И. С. Коротецкий, А. П. Богоявленский, А. Г. Прилипов [и др.] // Вопросы Вирусологии. – 2010. – Т. 55. – № 4. – С. 29-32.

11. Молекулярно-генетическая характеристика вируса болезни Ньюкасла Sterna/Astrakhan/2755/2001, изолированного в России / Е. В. Усачев, И. Т. Федякина, М. Ю. Щелканов [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2006. – № 1. – С. 14-20.

12. Определение генотипической принадлежности изолятов вируса ньюкаслской болезни, выявленных на территории Российской Федерации в 2006 году / И. П. Пчелкина, С. Н. Колосов, Т. Б. Манин [и др.] // Ветеринарная патология. – 2007. – № 4 (23). – С. 162-167.

13. Ртищев, А. А. Изоляция и молекулярная идентификация вируса ньюкаслской болезни, выделенного на домашних птицеводствах Подмосковья / А. А. Ртищев, А. А. Трещалина // Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН. ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. - Москва: «Перо», 2023. – С. 38-39.

14. Свинцов, П. М. Инфекционные болезни птиц / П. М. Свинцов, А. Я. Фомина, И. И. Очкина // Ветеринария. – 1947. – № 3. – С. 7.

15. Характеристика изолятов вируса ньюкаслской болезни, выделенных в Калининградской области в 2013 г. / И. П. Пчелкина, С. Н. Колосов, П. И. Репин [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2014. – Т. 12. – С. 77-85.

16. Чвала, И. А. Выявление вируса ньюкаслской болезни в популяциях птиц в России / И. А. Чвала // Ветеринария. – 2015. – № 1. – С. 15-18.

17. A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons / E. W. Aldous, C. M. Fuller, J. K. Mynn, D. J. Alexander // Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A. – 2004. – Vol. 33. – № 2. – P. 258-269.

18. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene / E. W. Aldous, J. K. Mynn, J. Banks, D. J. Alexander // Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A. – 2003. – Vol. 32. – № 3. – P. 239-256.

19. A simplified vaccination program elicits an immune response comparable to a complex standard vaccination program in commercial layers under field conditions / K. Martiny, J. P. Christensen, C. K. Hjulsgaard, L. E. Larsen // Veterinary Immunology and Immunopathology. – 2025. – Vol. 280. – P. 1-8.

20. A study of risk factors associated with Newcastle disease and molecular characterization of genotype XIII Newcastle disease virus in backyard and commercial poultry in Assam, India / P. Deka, M. K. Nath, S. Das [et al.] // Research in Veterinary Science. – 2022. – Vol. 150. – P. 122-130.

21. Abozaid, K. G. A. Epidemiological surveillance of Newcastle disease virus in Egypt - a 6-year cohort study / K. G. A. Abozaid, A. S. Abdel-Moneim // Tropical Animal Health and Production. – 2022. – Vol. 54. – № 4. – P. 1-9.

22. Alexander, D. J. Ecology and Epidemiology of Newcastle Disease / D. J. Alexander // Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual / eds. I. Capua, D. J. Alexander. – Milano: Springer Milan, 2009. – P. 19-26.

- 23.** Alexander, D. J. Newcastle Disease / D. J. Alexander // Newcastle disease diagnosis / ed. D. J. Alexander. – Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988. – P. 147-160.
- 24.** Alexander, D. J. Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*) - a review / D. J. Alexander // Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A. – 2000. – Vol. 29. – № 2. – P. 95-100.
- 25.** Alexander, D. J. Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009 / D. J. Alexander // Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A. – 2011. – Vol. 40. – № 6. – P. 547-558.
- 26.** Almubarak, A. I. A. Molecular and biological characterization of some circulating strains of Newcastle disease virus in broiler chickens from Eastern Saudi Arabia in 2012-2014 / A. I. A. Almubarak // Veterinary World. – 2019. – Vol. 12. – № 10. – P. 1668-1676.
- 27.** An attenuated recombinant Newcastle disease virus of genotype VII generated by reverse genetics / H. Pang, Y. Bo, J. Chen [et al.] // Viruses. – 2025. – № 17 (12). – P. 1-16.
- 28.** An epizootiological report of the re-emergence and spread of a lineage of virulent Newcastle disease virus into Eastern Europe / C. Fuller, B. Löndt, K. M. Dimitrov [et al.] // Transboundary and Emerging Diseases. – 2017. – Vol. 64. – № 3. – P. 1001-1007.
- 29.** An outbreak of Newcastle disease virus in the Moscow Region in the Summer of 2022 / A. Rtishchev, A. Treshchalina, E. Shustova [et al.] // Veterinary Sciences. – 2023. – Vol. 10. – № 6. – P. 1-12.
- 30.** Antigenic and genetic characterisation of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997 / D. J. Alexander, J. Banks, M. S. Collins [et al.] // The Veterinary Record. – 1999. – Vol. 145. – № 15. – P. 417-421.
- 31.** Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan between 1969 and 1996 / H.-J. Tsai, K.-H. Chang, C.-H. Tseng [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2004. – Vol. 104. – № 1-2. – P. 19-30.

32. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge / P. J. Miller, D. J. King, C. L. Afonso, D. L. Suarez // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25. – № 41. – P. 7238-7246.

33. Avian Influenza virus and Avian Paramyxoviruses in wild waterfowl of the Western Coast of the Caspian Sea (2017-2020) / T. Murashkina, K. Sharshov, A. Gadzhiev [et al.] // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16. – № 4. – P. 1-24.

34. Biological characterization and phylogenetic analysis of a novel genetic group of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in commercial poultry and from backyard poultry flocks in Pakistan / M. Munir, M. Cortey, M. Abbas [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 12. – № 5. – P. 1010-1019.

35. Characterization of emerging Newcastle disease virus isolates in China / J.-Y. Wang, W.-H. Liu, J.-J. Ren [et al.] // *Virology Journal*. – 2015. – Vol. 12. – P. 1-21.

36. Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons / J. E. Pearson, D. A. Senne, D. J. Alexander [et al.] // *Avian Diseases*. – 1987. – Vol. 31. – № 1. – P. 105-111.

37. Characterization of Newcastle disease virus in broiler flocks with respiratory symptoms in some provinces of Iran / F. Makki, Z. Boroomand, M. Mayahi, M. R. Seyfi Abad Shapouri // *Molecular Biology Reports*. – 2021. – Vol. 48. – № 11. – P. 7281-7291.

38. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan / L. Yu, Z. Wang, Y. Jiang [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2001. – Vol. 39. – № 10. – P. 3512-3519.

39. Characteristics of pigeon paramyxovirus serotype-1 isolates (PPMV-1) from the Russian Federation from 2001 to 2009 / I. P. Pchelkina, T. B. Manin, S. N. Kolosov [et al.] // *Avian Diseases*. – 2013. – Vol. 57. – № 1. – P. 2-7.

40. Characterization of pigeon paramyxoviruses (Newcastle disease virus) isolated in South Africa from 2001 to 2006 / C. Abolnik, G. H. Gerdes, J. Kitching [et al.] // *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. – 2008. – Vol. 75. – № 2. – P. 147-152.

41. Characterization of the genome sequence of an oncolytic Newcastle disease virus strain Italien / D. Wei, B. Yang, Y. Li [et al.] // *Virus Research*. – 2008. – Vol. 135. – № 2. – P. 312-319.

42. Characterization of the sites of proteolytic activation of Newcastle disease virus membrane glycoprotein precursors / J. J. Gorman, A. Nestorowicz, S. J. Mitchell [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1988. – Vol. 263. – № 25. – P. 12522-12531.

43. Characterization of velogenic Newcastle disease viruses isolated from dead wild birds in Serbia during 2007 / D. Vidanović, M. Sekler, R. Asanin [et al.] // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2011. – Vol. 47. – № 2. – P. 433-441.

44. Choppin, P. W. The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses / P. W. Choppin, A. Scheid // *Reviews of Infectious Diseases*. – 1980. – Vol. 2. – № 1. – P. 40-61.

45. Complete genome sequence of a velogenic Newcastle disease virus isolated from an apparently healthy village chicken in South India / A. Uthrakumar, K. Vijayarani, K. Kumanan [et al.] // *Genome Announcements*. – 2014. – Vol. 2. – № 3. – P. 1-2.

46. Complete genome sequence of genotype Ib Newcastle disease virus isolated from a mallard (*Anas platyrhynchos*) in Russia / K. S. Yurchenko, I. A. Sobolev, A. V. Glushchenko, A. M. Shestopalov // *Genome Announcements*. – 2015. – Vol. 3. – № 6. – P. 1-2.

47. Complete genome sequences of two Newcastle disease virus strains isolated from a wild duck and a pigeon in Russia / M. R. Kabilov, T. Y. Alikina, K. S. Yurchenko [et al.] // *Genome Announcements*. – 2016. – Vol. 4. – № 6. – P. 1-2.

48. Cormorants as potential victims and reservoirs of velogenic Newcastle disease virus (Orthoavulavirus-1) in Central Asia / K. Karamendin, A. Kydyrmanov, Y. Kasymbekov [et al.] // *Avian Diseases*. – 2019. – Vol. 63. – № 4. – P. 599-605.

49. Cox, R. M. Structure and organization of paramyxovirus particles / R. M. Cox, R. K. Plemper // *Current Opinion in Virology*. – 2017. – Vol. 24. – P. 105-114.

50. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples / M. G. Wise, D. L. Suarez, B. S. Seal [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – Vol. 42. – № 1. – P. 329-338.

51. Development of an L gene real-time reverse-transcription PCR assay for the detection of avian paramyxovirus type 1 RNA in clinical samples / C. M. Fuller, L. Brodd, R. M. Irvine [et al.] // *Archives of Virology*. – 2010. – Vol. 155. – № 6. – P. 817-823.

52. Doyle, T. M. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus / T. M. Doyle. – 1927. – Vol. 40. – P. 144-169.

53. Einfeld, A. J. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins / A. J. Einfeld, G. Neumann, Y. Kawaoka // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2015. – Vol. 13. – At the centre. – № 1. – P. 28-41.

54. Emergence and characterization of historically extinct virulent genotype IV Newcastle disease virus in wild and domestic birds: genetic insights, pathogenicity, and vaccine efficacy / W. Yan, X. Liu, S. Jiang [et al.] // *Journal of Virology*. – 2025. – Vol. 11. – P. 1-19.

55. Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa - implications for diagnosis and control / G. Cattoli, A. Fusaro, I. Monne [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2010. – Vol. 142. – № 3-4. – P. 168-176.

56. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus / P. J. Miller, L. M. Kim, H. S. Ip, C. L. Afonso // *Virology*. – 2009. – Vol. 391. – № 1. – P. 64-72.

57. Experimental assessment of the pathogenicity of the Newcastle disease viruses from outbreaks in Great Britain in 1997 for chickens and turkeys, and the protection afforded by vaccination / D. J. Alexander, R. J. Manvell, J. Banks [et al.] // *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* – 1999. – Vol. 28. – № 5. – P. 501-511.

58. Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo / T. Ogasawara, B. Gotoh, H. Suzuki [et al.] // *The EMBO journal*. – 1992. – Vol. 11. – № 2. – P. 467-472.

59. Field outbreak investigation and immunoinformatic analysis suggest potential immune evasion by Newcastle disease virus sub-genotype XIV.2 in Nigeria / M. U. Sajo, S. M. Hyeladzira, Y. M. Shettima [et al.]. – 2025. – *Scientific Reports*. – № 15. – P. 1-14.

60. First molecular characterization of avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) in Botswana / T. Kgotlele, B. Modise, J. F. Nyange [et al.] // *Virus Genes*. – 2020. – Vol. 56. – № 5. – P. 646-650.

61. Genetic diversity and mutation of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) in wild birds and evidence for intercontinental spread / A. M. Ramey, A. B. Reeves, H. Ogawa [et al.] // *Archives of Virology*. – 2013. – Vol. 158. – № 12. – P. 2495-2503.

62. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes / D. G. Diel, L. H. A. da Silva, H. Liu [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 12. – № 8. – P. 1770-1779.

63. Genetic diversity of Newcastle disease virus and its implications for vaccine development / O. A. Kondakova, A. A. Agranovsky, E. M. Ryabchevskaya [et al.] // *Veterinary Sciences*. – 2025. – Vol. 12. – № 9. – P. 858.

64. Genetic diversity of Newcastle disease virus in Pakistan: a countrywide perspective / M. Z. Shabbir, S. Zohari, T. Yaqub [et al.] // *Virology Journal*. – 2013. – Vol. 10. – P. 170.

65. Genetic diversity of Newcastle disease viruses circulating in wild and synanthropic birds in Ukraine between 2006 and 2015 / I. V. Goraichuk, A. Gerilovych, V. Bolotin [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2023. – Vol. 10. – P. 1-13. 173

66. Genetic diversity of the genotype VII Newcastle disease virus: identification of a novel VIIj sub-genotype / C. Xue, Y. Cong, R. Yin [et al.] // *Virus Genes*. – 2017. – Vol. 53. – № 1. – P. 63-70.

67. Genome. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/> (date accessed: 02.12.2025). – Text: electronic.

68. Genotypic and pathogenic characterization of genotype VII Newcastle disease viruses isolated from commercial farms in Egypt and evaluation of heterologous antibody responses / A. M. Saad, A. Samy, M. A. Soliman [et al.] // *Archives of Virology*. – 2017. – Vol. 162. – № 7. – P. 1985-1994.

69. Genus: Orthoavulavirus | c. – URL: <https://ictv.global/report/chapter/paramyxoviridae/paramyxoviridae/orthoavulavirus> (date accessed: 02.12.2025). – Text: electronic.

70. Global phylodynamic analysis of avian paramyxovirus-1 provides evidence of inter-host transmission and intercontinental spatial diffusion / J. T. Hicks, K. M. Dimitrov, C. L. Afonso [et al.] // BMC evolutionary biology. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 2-15.

71. Hanson, R. P. Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus / R. P. Hanson, C. A. Brandly // Science (New York, N.Y.). – 1955. – Vol. 122. – № 3160. – P. 156-157.

72. High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII / C. J. Snoeck, A. A. Owoade, E. Couacy-Hymann [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2013. – Vol. 51. – № 7. – P. 2250-2260.

73. High pathogenicity and low genetic evolution of avian paramyxovirus type I (Newcastle disease virus) isolated from live bird markets in Uganda / D. K. Byarugaba, K. K. Mugimba, J. B. Omony [et al.] // Virology Journal. – 2014. – Vol. 11. – P. 1-13.

74. Highly divergent virulent isolates of Newcastle disease virus from the Dominican Republic are members of a new genotype that may have evolved unnoticed for over 2 decades / S. C. Courtney, L. Susta, D. Gomez [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2013. – Vol. 51. – № 2. – P. 508-517.

75. Highly virulent Newcastle disease virus in Eurasian Collared Doves in the North of Portugal / G. Moreira, S. Rodrigues, S. Gomes-Gonçalves [et al.] // Animals. – 2025. – Vol. 15. – P. 1-16.

76. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene / A. Ballagi-Pordány, E. Wehmann, J. Herczeg [et al.] // Archives of Virology. – 1996. – Vol. 141. – № 2. – P. 243-261.

77. Identification of a genotype VIIId Newcastle disease virus isolated from Sansui sheldrake ducks in Guizhou province, China / Z. Duan, X. Ji, H. Xu [et al.] // Genome Announcements. – 2015. – Vol. 3. – № 2. – P. 1-2.

78. Identification of new sub-genotypes of virulent Newcastle disease virus with potential panzootic features / P. J. Miller, R. Haddas, L. Simanov [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 29. – P. 216-229.

79. Identification of Newcastle disease virus subgenotype VII.2 in wild birds in Turkey / N. Turan, C. Ozsemir, A. Yilmaz [et al.] // *BMC veterinary research*. – 2020. – Vol. 16. – № 1. – P. 1-8.

80. Identification of novel Newcastle disease virus sub-genotype VII-(j) based on the fusion protein / M. Esmaelizad, V. Mayahi, M. Pashaei, H. Goudarzi // *Archives of Virology*. – 2017. – Vol. 162. – № 4. – P. 971-978.

81. Isolation and identification of the Newcastle disease virus from field outbreaks in broiler and layer flocks in Iraq / M. T. B. AL-Zuhariy, S. H. Abdulmaged, R. H. S. Rabee, A. A. A. AL-Baldawi // *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*. – 2017. – Vol. 41. – № 1. – P. 23-27.

82. Isolation and phylogenetic analysis of Avian orthoavulavirus 1 sub-genotypes VII.2 and XXI.1.2 from caged birds in the Lahore district, Pakistan - Short communication / S. Nasir, A. Wajid, A. Naureen [et al.] // *Acta Veterinaria Hungarica*. – 2022. – Vol. 70. – № 1. – P. 73-76.

83. Isolation, identification, and molecular characterization of Newcastle disease virus from field outbreaks in chickens in Afghanistan / H. Kabir, H. Hakim, M. N. Alizada [et al.] // *Avian Diseases*. – 2022. – Vol. 66. – № 2. – P. 176-180.

84. Isolation, identification and molecular characterization of Newcastle disease viruses in vaccinated chickens from commercial farms in the Sultanate of Oman / A. A. Alsahami, A. Ideris, A. Omar [et al.] // *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. – 2018. – Vol.6. – №2. – P.248-252.

85. Kaleta, E.F. The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons? / E. F. Kaleta, D. J. Alexander, P. H. Russell // *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* – 1985. – Vol.14. – №4. – P.553-557.

- 86.** Karamendin, K. Cormorants as a Potentially Important Reservoir and Carrier of Newcastle Disease Virus on the Asian Continent / K. Karamendin, A. Kydyrmanov // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2021. – Vol. 8. – P. 1-5.
- 87.** Kim, S.-H. Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector for Development of Human and Veterinary Vaccines / S.-H. Kim, S. K. Samal // *Viruses*. – 2016. – Vol. 8. – № 7. – P. 1-15.
- 88.** Klenk, H. D. Host cell proteases controlling virus pathogenicity / H. D. Klenk, W. Garten // *Trends in Microbiology*. – 1994. – Vol. 2. – № 2. – P. 39-43.
- 89.** Kraneveld, F. C. A poultry disease in the Dutch East Indies / F. C. Kraneveld. – 1926. – Vol. 38. – P. 448-450.
- 90.** Lack of detection of host associated differences in Newcastle disease viruses of genotype VIIId isolated from chickens and geese / Y. Wang, Z. Duan, S. Hu [et al.] // *Virology Journal*. – 2012. – Vol. 9. – P. 1-15.
- 91.** Lamb, R. A. Fields virology / R. A. Lamb, G. D. Parks // *Paramyxoviridae: the viruses and their replication* / eds. D. M. Knipe, P. M. Howley. – Lippincott-Raven Press, 1996. – P. 1449-1496.
- 92.** Lamb, R. A. Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F / R. A. Lamb, T. S. Jardetzky // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2007. – Vol. 17. – № 4. – P. 427-436.
- 93.** Levine, P. P. Newcastle disease an evolving pathogen / P. P. Levine // *Newcastle Disease* / ed. R. P. Hanson. – Madison: The University of Wisconsin Press, 1964. – P. 65-69.
- 94.** Liu, H. L. Studies on biological characterization of fusion gene of chicken's paramyxovirus / H. L. Liu, Y. K. Wang, G. Q. Zhu. – 2002. – P. 119-122.
- 95.** Madansky, C. H. Noncytopathic mutants of Newcastle disease virus are defective in virus-specific RNA synthesis / C. H. Madansky, M. A. Bratt // *Journal of Virology*. – 1981. – Vol. 37. – № 1. – P. 317-327.
- 96.** Mase, M. Genotyping of Newcastle disease viruses isolated from 2001 to 2007 in Japan / M. Mase, T. Inoue, T. Imada // *The Journal of Veterinary Medical Science*. – 2009. – Vol. 71. – № 8. – P. 1101-1104.

97. Mayahi, V. Molecular evolution and epidemiological links study of Newcastle disease virus isolates from 1995 to 2016 in Iran / V. Mayahi, M. Esmaelizad // Archives of Virology. – 2017. – Vol. 162. – № 12. – P. 3727-3743.

98. McGinnes, L. W. Newcastle disease virus HN protein alters the conformation of the F protein at cell surfaces / L. W. McGinnes, K. Gravel, T. G. Morrison // Journal of Virology. – 2002. – Vol. 76. – № 24. – P. 12622-12633.

99. Mechanisms and consequences of Newcastle disease virus W protein subcellular localization in the nucleus or mitochondria / Y. Yang, J. Xue, Q. Teng [et al.] // Journal of Virology. – 2021. – Vol. 95. – № 7. – P. 1-18.

100. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2018. – Vol. 35. – № 6. – P. 1547-1549.

101. Meta-analysis of Newcastle disease virus prevalence among poultry in mainland China / W. Cheng, M. Chu, H. Zhang [et al.] // Open Veterinary Journal. – 2025. – Vol. 15. – № 9. – P. 4382-4392.

102. Miller, P. J. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges / P. J. Miller, E. L. Decanini, C. L. Afonso // Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 10. – № 1. – P. 26-35.

103. Molecular and virological characterization of the first poultry outbreaks of Genotype VII.2 velogenic avian orthoavulavirus type 1 (NDV) in North-West Europe, BeNeLux, 2018 / M. Steensels, S. Van Borm, I. Mertens [et al.] // Transboundary and Emerging Diseases. – 2021. – Vol. 68. – № 4. – P. 2147-2160.

104. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds / F. Zanetti, A. Berinstein, A. Pereda [et al.] // Avian Diseases. – 2005. – Vol. 49. – № 4. – P. 546-550.

105. Molecular characterization of a virulent genotype VIIId strain of Newcastle disease virus from farmed chickens in Shanghai / J. Yi, C. Liu, B. Chen, S. Wu // Avian Diseases. – 2011. – Vol. 55. – № 2. – P. 279-284.

106. Molecular characterization of chicken-derived genotype VII_d Newcastle disease virus isolates in China during 2005-2012 reveals a new length in hemagglutinin-neuraminidase / Y.-Y. Zhang, M.-Y. Shao, X.-H. Yu [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 21. – P. 359-366.

107. Molecular characterization of Newcastle disease viruses isolated from chickens in Tanzania and Ghana / A. P. da Silva, E. J. Aston, G. H. Chiwanga [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 9. – P. 1-14.

108. Molecular characterization of velogenic Newcastle disease virus (sub-genotype VII.1.1) from wild birds, with assessment of its pathogenicity in susceptible chickens / K. S. Abd Elfatah, M. A. Elabasy, F. El-Khyate [et al.] // *Animals: an open access journal from MDPI*. – 2021. – Vol. 11. – № 2. – P. 1-21.

109. Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses in Vietnam / K.-S. Choi, S.-J. Kye, J.-Y. Kim [et al.] // *Tropical Animal Health and Production*. – 2014. – Vol. 46. – № 1. – P. 271-277.

110. Molecular evaluation and genetic characterisation of Newcastle disease virus's haemagglutinin-neuraminidase protein isolated from broiler chickens in Iran / M. Shafaati, M. Ghorbani, M. Mahmodi [et al.] // *Veterinary Medicine and Science*. – 2022. – Vol. 8. – № 1. – P. 219-228.

111. Multifunctionality of matrix protein in the replication and pathogenesis of Newcastle disease virus: A review / Z. Duan, Q. Zhang, M. Liu, Z. Hu // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – Vol. 249. – P. 126089.

112. Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: effects on pathogenicity / W. Garten, W. Berk, Y. Nagai [et al.] // *The Journal of General Virology*. – 1980. – Vol. 50. – № 1. – P. 135-147.

113. Mutations in the methyltransferase motifs of L protein attenuate Newcastle disease virus by regulating viral translation and cell-to-cell spread / X. Li, L. Sun, J. Zhao [et al.] // *Microbiology Spectrum*. – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. 1-22.

114. Nagai, Y. Activation of precursors to both glycoproteins of Newcastle disease virus by proteolytic cleavage / Y. Nagai, H. D. Klenk // *Virology*. – 1977. – Vol. 77. – № 1. – P. 125-134.

115. Nagai, Y. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus / Y. Nagai, H. D. Klenk, R. Rott // *Virology*. – 1976. – Vol. 72. – № 2. – P. 494-508.

116. NDV subgenotype VII(L) is currently circulating in commercial broiler farms of Iran, 2017-2018 / A. Molouki, M. H. F. Mehrabadi, M. Bashashati [et al.] // *Tropical Animal Health and Production*. – 2019. – Vol. 51. – № 5. – P. 1247-1252.

117. Nearly complete genome sequence of a Newcastle disease virus strain isolated from a wild garganey (*Spatula querquedula*) in Russia / A. V. Glushchenko, T. Y. Alikina, K. S. Yurchenko [et al.] // *Microbiology Resource Announcements*. – 2019. – Vol. 8. – № 50. – P. 1-2.

118. Newcastle disease in geese: natural occurrence and experimental infection / H. Wan, L. Chen, L. Wu, X. Liu // *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* – 2004. – Vol. 33. – № 2. – P. 216-221.

119. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and avian metapneumovirus infections / D. L. Suarez, P. J. Miller, G. Koch [et al.] // *Diseases of Poultry* / eds. Swayne, David E. [et al.]. – Wiley, 2019. – P. 111-166.

120. Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII) / B. Lomniczi, E. Wehmann, J. Herczeg [et al.] // *Archives of Virology*. – 1998. – Vol. 143. – № 1. – P. 49-64.

121. Newcastle disease virus: current status and our understanding / K. Ganar, M. Das, S. Sinha, S. Kumar // *Virus Research*. – 2014. – Vol. 184. – P. 71-81.

122. Newcastle disease virus evolution. I. Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene / T. Sakaguchi, T. Toyoda, B. Gotoh [et al.] // *Virology*. – 1989. – Vol. 169. – № 2. – P. 260-272.

123. Newcastle disease virus evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains / T. Toyoda, T. Sakaguchi, H. Hirota [et al.] // *Virology*. – 1989. – Vol. 169. – № 2. – P. 273-282.

- 124.** Newcastle disease virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase proteins contribute to its macrophage host range / I. Cornax, D. G. Diel, C. A. Rue [et al.] // The Journal of General Virology. – 2013. – Vol. 94. – № 6. – P. 1189-1194.
- 125.** Newcastle disease virus in Madagascar: identification of an original genotype possibly deriving from a died out ancestor of genotype IV / O. F. Maminiana, P. Gil, F.-X. Briand [et al.] // PloS One. – 2010. – Vol. 5. – № 11. – P. 1-12.
- 126.** Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms / C. J. Snoeck, M. F. Ducatez, A. A. Owoade [et al.] // Archives of Virology. – 2009. – Vol. 154. – № 1. – P. 47-54.
- 127.** Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cells / D. P. Locke, H. S. Sellers, J. M. Crawford [et al.] // Virus Research. – 2000. – Vol. 69. – № 1. – P. 55-68.
- 128.** Nourani, E. An assessment of threats to Anatidae in Iran / E. Nourani, M. Kaboli, B. Collen // Bird Conservation International. – 2015. – Vol. 25. – № 2. – P. 242-257.
- 129.** Nucleocapsid assembly in pneumoviruses is regulated by conformational switching of the N protein / M. Renner, M. Bertinelli, C. Leyrat [et al.] // eLife. – 2016. – Vol. 5. – P. 1-12.
- 130.** Optimization and validation of universal real-time RT-PCR assay to detect virulent Newcastle disease viruses / E. R. Alexander Morris, M. E. Schroeder, P. N. Anderson [et al.] // Viruses. – 2025. – Vol. 17. – № 5. – P. 1-16.
- 131.** Outbreak of Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*) in south-east England in July 2005 / E. W. Aldous, R. J. Manvell, W. J. Cox [et al.] // The Veterinary Record. – 2007. – Vol. 160. – № 14. – P. 482-484.
- 132.** Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001 / X. F. Liu, H. Q. Wan, X. X. Ni [et al.] // Archives of Virology. – 2003. – Vol. 148. – № 7. – P. 1387-1403.
- 133.** Phylogenetic analysis of avian paramyxoviruses 1 isolated in Taiwan from 2010 to 2018 and evidence for their intercontinental dispersal by migratory birds / Y.-P.

Liu, C.-Y. Chang, F. Lee [et al.] // The Journal of Veterinary Medical Science. – 2020. – Vol. 82. – № 9. – P. 1366-1375.

134. Phylogenetic analysis of Newcastle disease viruses isolated from commercial poultry in Mozambique (2011-2016) / L. P. Mapaco, I. V. A. Monjane, A. E. Nhamusso [et al.] // Virus Genes. – 2016. – Vol. 52. – № 5. – P. 748-753.

135. Phylogenetic and pathogenic analyses of two virulent Newcastle disease viruses isolated from Crested Ibis (*Nipponia nippon*) in China / S. Chen, H. Hao, Q. Liu [et al.] // Virus Genes. – 2013. – Vol. 46. – № 3. – P. 447-453.

136. Phylogenetic and pathotypical analysis of two virulent Newcastle disease viruses isolated from domestic ducks in China / S. Zhang, X. Wang, C. Zhao [et al.] // PloS One. – 2011. – Vol. 6. – № 9. – P. 1-9.

137. Phylogenetic assessment reveals continuous evolution and circulation of pigeon-derived virulent avian avulaviruses 1 in Eastern Europe, Asia, and Africa / M. Sabra, K. M. Dimitrov, I. V. Goraichuk [et al.] // BMC veterinary research. – 2017. – Vol. 13. – № 1. – P. 1-13.

138. Phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease viruses isolated during outbreaks in northwestern Iran in 2010 / E. Ahmadi, S. A. Pourbakhsh, M. Ahmadi [et al.] // Archives of Virology. – 2016. – Vol. 161. – № 11. – P. 3151-3160.

139. Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates / L. M. Kim, D. J. King, P. E. Curry [et al.] // Journal of Virology. – 2007. – Vol. 81. – № 22. – P. 12641-12653.

140. Phylogenetic relationship and genotype variation of six Newcastle disease viruses isolated from duck in Indonesia / N. Putri, R. Ernawati, J. Rahmahani [et al.] // Veterinary World. – 2021. – Vol. 14. – № 1. – P. 276-284.

141. Point mutation revealed the resurgence of sub-genotype VII.2 Newcastle disease virus in Israel / A. Wiseman, M. Shabbat, A. Cohen [et al.] // Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A. – 2022. – Vol. 51. – № 3. – P. 236-243.

142. Pospíšil, Z. Unexpected Emergence of Newcastle Disease Virus in Very Young Chicks / Z. Pospíšil, D. Zendulková, B. Šmíd // *Acta Veterinaria Brno.* – 1991. – Vol. 60 (3). – P. 263-270.

143. Posterior summarization in bayesian phylogenetics using tracer 1.7 / A. Rambaut, A. J. Drummond, D. Xie [et al.] // *Systematic Biology.* – 2018. – Vol. 67. – № 5. – P. 901-904.

144. Potential disease transmission from wild geese and swans to livestock, poultry and humans: a review of the scientific literature from a One Health perspective / J. Elmberg, C. Berg, H. Lerner [et al.] // *Infection Ecology & Epidemiology.* – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-21.

145. Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations / H. Takakuwa, T. Ito, A. Takada [et al.] // *The Japanese Journal of Veterinary Research.* – 1998. – Vol. 45. – № 4. – P. 207-215.

146. Predominance of fourth panzootic Newcastle disease virus subgenotype VII.1.1 in Iran and its relation to the genotypes circulating in the region / A. Molouki, M. Sotani, M. H. Fallah Mehrabadi [et al.] // *Current Microbiology.* – 2021. – Vol. 78. – № 8. – P. 3068-3078.

147. Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus / R. L. Glickman, R. J. Syddall, R. M. Iorio [et al.] // *Journal of Virology.* – 1988. – Vol. 62. – № 1. – P. 354-356.

148. Repeated isolation of virulent Newcastle disease viruses of sub-genotype VII_d from backyard chickens in Bulgaria and Ukraine between 2002 and 2013 / K. M. Dimitrov, V. Bolotin, D. Muzyka [et al.] // *Archives of Virology.* – 2016. – Vol. 161. – № 12. – P. 3345-3353.

149. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence / B. P. Peeters, O. S. de Leeuw, G. Koch, A. L. Gielkens // *Journal of Virology.* – 1999. – Vol. 73. – № 6. – P. 5001-5009.

150. Reverse transcription recombinase-aided amplification assay for Newcastle disease virus in poultry / N. Yehia, A. Abd El Wahed, A. A. E. Mohamed [et al.] // *Pathogens* (Basel, Switzerland). – 2025. – Vol. 14. – № 9. – P. 1-12.

151. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus / A. Panda, Z. Huang, S. Elankumaran [et al.] // *Microbial Pathogenesis*. – 2004. – Vol. 36. – № 1. – P. 1-10.

152. Role of Pigeons in the Transmission of Avian Avulavirus (Newcastle Disease-Genotype VIIId) to Chickens / H. F. Ellakany, A. R. Elbestawy, H. S. Abd El-Hamid [et al.] // *Animals: an open access journal from MDPI*. – 2019. – Vol. 9. – № 6. – P. 1-15.

153. Rott, R. Molecular Basis of Infectivity and Pathogenicity of Newcastle Disease Virus / R. Rott, H.-D. Klenk // *Newcastle Disease* / ed. D. J. Alexander. – Boston, MA: Springer US, 1988. – P. 98-112.

154. Sabouri, F. Characterization of a novel VIII sub-genotype of Newcastle disease virus circulating in Iran / F. Sabouri, M. Vasfi Marandi, M. Bashashati // *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* – 2018. – Vol. 47. – № 1. – P. 90-99.

155. Saputri, M. E. Phylogenetic studies of Newcastle disease virus isolated from poultry flocks in South Sulawesi Province, Indonesia, in 2019 / M. E. Saputri, O. N. Poetri, R. D. Soejoedono // *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. – 2021. – Vol. 8. – № 1. – P. 129-137.

156. Seal, B. S. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences / B. S. Seal // *Functional & Integrative Genomics*. – 2004. – Vol. 4. – № 4. – P. 246-257.

157. Sequence analysis and pathogenicity of Avian Orthoavulavirus 1 strains isolated from poultry flocks during 2015-2019 / H. S. Abd El-Hamid, M. E. Shafi, N. M. Albaqami [et al.] // *BMC veterinary research*. – 2020. – Vol. 16. – № 1. – P. 1-15.

158. Sequence analysis of fusion protein gene of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in Egypt during 2006 / M. H. A. Mohamed, S. Kumar, A. Paldurai, S. K. Samal // *Virology Journal*. – 2011. – Vol. 8. – P. 1-4.

159. Structure analysis of the nucleoprotein of Newcastle disease virus: An insight towards its multimeric form in solution / B. Nath, K. Sharma, K. Ahire [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 151. – P. 402-411.

160. Structure of the Newcastle disease virus L protein in complex with tetrameric phosphoprotein / J. Cong, X. Feng, H. Kang [et al.] // Nature Communications. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 1-12.

161. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme / J. M. White, S. E. Delos, M. Brecher, K. Schornberg // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. – 2008. – Vol. 43. – № 3. – P. 189-219.

162. Surveillance and molecular characterization of Newcastle disease virus in seafowl from coastal areas of China in 2011 / X. Yuan, Y. Wang, J. Li [et al.] // Virus Genes. – 2013. – Vol. 46. – № 2. – P. 377-382.

163. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus) / K. M. Dimitrov, A. M. Ramey, X. Qiu [et al.] // Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases. – 2016. – Vol. 39. – P. 22-34.

164. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications / A. Czeglédi, D. Ujvári, E. Somogyi [et al.] // Virus Research. – 2006. – Vol. 120. – № 1-2. – P. 36-48.

165. Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe / J. Herczeg, E. Wehmann, R. R. Bragg [et al.] // Archives of Virology. – 1999. – Vol. 144. – № 11. – P. 2087-2099.

166. Ujvári, D. Complete nucleotide sequence of IT-227/82, an avian paramyxovirus type-1 strain of pigeons (*Columba livia*) / D. Ujvári // Virus Genes. – 2006. – Vol. 32. – № 1. – P. 49-57.

167. Unexpected isolation of virulent Newcastle disease virus from commercial embryonated fowls' eggs / I. Capua, M. Scacchia, T. Toscani, V. Caporale // Zentralbl Veterinarmed B. - 1993. - Vol. 40(9-10). - P. 609-612.

168. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus / K. M. Dimitrov, C. Abolnik, C. L. Afonso [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. – 2019. – Vol. 74. – P. 1-15.

169. Variation of a Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase linear epitope / S.-H. Cho, H.-J. Kwon, T.-E. Kim [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2008. – Vol. 46. – № 4. – P. 1541-1544.

170. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein / O. S. de Leeuw, G. Koch, L. Hartog [et al.] // *The Journal of General Virology*. – 2005. – Vol. 86. – № 6. – P. 1759-1769.

171. Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? / J. C. F. M. Dortmans, G. Koch, P. J. M. Rottier, B. P. H. Peeters // *Veterinary Research*. – 2011. – Vol. 42. – № 1. – P. 1-11.

172. Virulent Newcastle disease virus genotypes V.3, VII.2, and XIII.1.1 and their coinfections with infectious bronchitis viruses and other avian pathogens in backyard chickens in Tanzania / H. M. Kariithi, J. D. Volkening, G. H. Chiwanga [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2023. – Vol. 10. – P. 1-14.

173. W protein expression by Newcastle disease virus / J. Karsunke, S. Heiden, M. Murr [et al.] // *Virus Research*. – 2019. – Vol. 263. – P. 207-216.

174. WOA. Newcastle Disease (Infection with Newcastle Disease Virus) / WOA // *Manual of Diagnostics Test and Vaccines for Terrestrial Animals*. – 2021. – Vol. 3.3.14. – P. 1-21.

175. WOA. Newcastle Disease. – URL: <https://www.woah.org/en/disease/newcastle-disease/> (date accessed: 02.12.2025). – Text: electronic.

176. Wobeser, G. A. Duck Plague / G. A. Wobeser // *Diseases of Wild Waterfowl*. – Boston, MA: Springer US, 1997. – P. 15-27.

6. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ВЫЯВЛЕНИЮ РНК ИЗОЛЯТОВ *AVIAN ORTHOAVULAVIRUS 1*
ГЕНОТИПА VII И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ С ПОМОЩЬЮ ОТ-ПЦР В
РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Авторы: Гусева Н.А.
Колосов С.Н.
Андреев А.В.
Козлов А.А.
Зиняков Н.Г.
Овчинникова Е.В.
Андрейчук Д.Б.
Чвала И.А.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 07
от 28 декабря 2022 г.



КОПИЯ
ОБЩЕСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ
КОЗЛОВ Л. Б.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 08
от «28» декабря 2022 г.

Владимир 2022

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора

И.А. Чвала

«30» 11 2022 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ГЕНОВ F И HN
ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ ГЕНОТИПА VI С
ПОМОЩЬЮ ОТ-ПЦР И НУКЛЕОТИДНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Авторы: Гусева Н.А.
Колосов С.Н.
Андрясков А.В.
Зиняков Н.Г.
Грехнева А.Д.
Шагурина Е.В.
Андрейчук Д.Б.
Чвала И.А.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 06
от «29» ноября 2022 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 07
от «30» ноября 2022 г.

Владимир 2022



Юлия ВЕРНА
УЧЕБНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ОХВАТИЛОВА Л. Б.

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора
по НИР

И.А. Чвала

«*И.А. Чвала*» 2024 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК С ПОМОЩЬЮ
РЕАКЦИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ
НАНОФОР-05

Авторы:
Зиняков Н.Г.
Грехнева А.Д.
Гусева Н.А.
Андрейчук Д.Б.
Чвала И.А.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 05
от «30» августа 2024 г.



КОПИЯ
И.А. ЧВАЛА
СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 05
от «11» сентября 2024 г.

Владимир 2024



Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)
**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**



Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру. Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья.
Референтный центр ФАО по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии

600901, Россия, Владимирская область,
г. Владимир, мкр. Юрвец
тел.: (4922) 26-06-14, тел./факс: 26-38-77
E-mail: mail@arriah.ru

« ____ » _____ 20 ____ г.
№ _____
(заполняется при отправке)

СПРАВКА № 298 - деп / 20-86
о депонировании штамма
«NDV / chicken / Rus / Primorsk / 5636 / 19»
вируса ньюкаслской болезни

Форма депонирования: «Хранение».

Авторы штамма: И.А. Чвала, В.Ю. Сосипаторова, А.В. Андриясов, Н.Г. Зиняков, С.Н. Колосов, Н.А. Гусева, Ир.А. Чвала, М.А. Волкова, А.А. Козлов, Д.Б. Андрейчук.
Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вирус был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2019г. из патологического материала, полученного от кур и поступившего из ЛПХ села Новоселище Ханкайского района Приморского края РФ.

Штамм адаптирован к 9-11-суточным СПФ-эмбрионам кур в условиях ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Штамм относится к отряду *Mononegavirales*, семейству *Paramyxoviridae*, подсемейству *Avulavirinae*, роду *Orthoavulavirus*, виду *Avian orthoavulavirus 1*.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Регистрационный номер: № 298 - деп / 20-86 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Местом хранения штамма определена Государственная коллекция штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрвец).

Дата депонирования штамма: 07 декабря 2020 г.

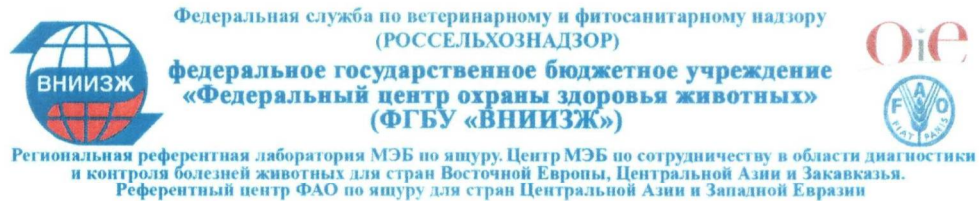
Заместитель директора по НИР и качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ»  А.Е. Метлин
« ____ » _____ 2020г.

Руководитель Государственной коллекции штаммов
микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»



600901, Россия, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрвец
тел.: (4922) 26-06-14, тел./факс: (4922) 26-38-77
E-mail: mail@arriah.ru

Юлия Верна
Ученый секретарь
ПРОХВАТОВА Л. В.



600901, Россия, Владимирская область,
г. Владимир, мкр. Юрьевец
тел.: (4922) 26-06-14, тел./факс: 26-38-77
E-mail: mail@arriah.ru

« ____ » _____ 20 ____ г.
№ _____
(заполняется при отправке)

СПРАВКА № 297 - деп / 20-85
о депонировании штамма
«NDV / poultry / Rus / Kursk / 5497 / 19»
вируса ньюкаслской болезни

Форма депонирования: «Хранение».

Авторы штамма: И.А. Чвала, В.Ю. Сосипаторова, А.В. Андриясов, Н.Г. Зиняков, С.Н. Колосов, Н.А. Гусева, Ир.А. Чвала, М.А. Волкова, Е.В. Овчинникова, З.Б. Никонова, Д.Б. Андрейчук.

Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вирус был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2019г. из патологического материала, полученного от кур и поступившего из частного сектора хутора Кислино Курского района Курской области РФ.

Штамм адаптирован к 9-11-суточным СПФ-эмбрионам кур в условиях ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Штамм относится к отряду *Mononegavirales*, семейству *Paramyxoviridae*, подсемейству *Avulavirinae*, роду *Orthoavulavirus*, виду *Avian orthoavulavirus 1*.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Регистрационный номер: № 297 - деп / 20-85 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Местом хранения штамма определена Государственная коллекция штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрьевец).

Дата депонирования штамма: 07 декабря 2020 г.

Заместитель директора по НИР и качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ»

А.Е. Метлин
2020г.

Руководитель Государственной коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.А. Похвальный
« 07 » 12 2020г.



600901, Россия, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец
тел.: (4922) 26-06-14, тел./факс: (4922) 26-38-77
E-mail: mail@arriah.ru



Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)



Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру. Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья.
Референтный центр ФАО по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии

600901, Россия, Владимирская область,
г. Владимир, мкр. Юрьевец
тел.: (4922) 26-06-14, тел./факс: 26-38-77
E-mail: mail@arriah.ru

« ____ » _____ 20 ____ г.

№ _____
(заполняется при отправке)

СПРАВКА № 296 - деп / 20-84

о депонировании штамма

«NDV / chicken / Rus / Stavropol / 509 / 19»

вируса ньюкаслской болезни

Форма депонирования: «Хранение».

Авторы штамма: И.А. Чвала, В.Ю. Сосипаторова, А.В. Андриясов, Н.Г. Зиняков, С.Н. Колосов, Н.А. Гусева, Ир.А. Чвала, М.А. Волкова, Е.В. Овчинникова, Д.Б. Андрейчук.

Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вirus был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2019г. из патологического материала, полученного от кур и поступившего из ЛПХ села Татарка Шпаковского района Ставропольского края РФ.

Штамм адаптирован к 9-11-суточным СПФ-эмбрионам кур в условиях ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Штамм относится к отряду *Mononegavirales*, семейству *Paramyxoviridae*, подсемейству *Avulavirinae*, роду *Orthoavulavirus*, виду *Avian orthoavulavirus 1*.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Регистрационный номер: № 296 - деп / 20-84 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Местом хранения штамма определена Государственная коллекция штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрьевец).

Дата депонирования штамма: 07 декабря 2020 г.

Заместитель директора по НИР и качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ»

А.Е. Метлин
2020г.

Руководитель Государственной коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.А. Похвальный
12 2020г.



600901, Россия, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец
тел.: (4922) 26-06-14, тел./факс: (4922) 26-38-77
E-mail: mail@arriah.ru



Россельхознадзор

федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Федеральный центр
охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

600901, Россия, Владимирская область, город Владимир,
микрорайон Юрвец,
т.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77
e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527170001,
ОГРН: 1023301283720,
ИНН/КПП: 3327100048/332701001

№

(заполняется при отправке)

СПРАВКА № 346 - деп / 21-7
о депонировании штамма
«NDV / chicken / Rus / Vladimir / 985 / 20»
вируса ньюкаслской болезни

Форма депонирования: «Гарантийное хранение».

Авторы штамма: В.Ю. Сосипаторова, Н.А. Гусева, Н.Г. Зиняков, А.В. Андриясов, М.А. Волкова, П.Д. Жестков, Е.В. Овчинникова, А.А. Козлов, С.Н. Колосов, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала.

Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вирус был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2020г. из патологического материала, полученного от кур и поступившего из частного сектора деревни Пенкино Камешковского района Владимирской области РФ.

Штамм адаптирован к 9-11-суточным СПФ-эмбрионам кур в условиях ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Штамм относится к отряду *Mononegavirales*, семейству *Paramyxoviridae*, подсемейству *Avulavirinae*, роду *Orthoavulavirus*, виду *Avian orthoavulavirus 1*.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Регистрационный номер: № 346 - деп / 21-7 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Местом хранения штамма определена Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрвец).

Дата депонирования штамма: 26 ноября 2021 г.

Срок хранения штамма в ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» до 12.2031 г.

Заместитель директора по НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Руководитель ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

И.А. Чвала
« 26 » 11 2021г.

С.А. Похвальный
« 26 » 11 2021г.





Россельхознадзор

федеральное государственное бюджетное учреждение

«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья.
 Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья. Референтная лаборатория МЭБ по высокопатогенному гриппу птиц, низкопатогенному гриппу птиц и болезни Ньюкасла. Референтный центр ФАО по ящуру.

600901, Россия, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрвец,
 т.: (4922) 26-06-14, т/ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
 ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

« 25 » / 11 / 20 22 г.

СПРАВКА №375 - деп / 22-9

о депонировании штамма «NDV / chicken / Rus / Khanty-Mansi / 1240-1 / 21»
 вируса ньюкаслской болезни

Форма депонирования: «Хранение».

Авторы штамма: Гусева Н.А., Жестков П.Д., Зиняков Н.Г., Никонова З.Б.,
 Козлов А.А., Волкова М.А., Андриясов А.В., Колосов С.Н., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.

Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»
 (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вирус ньюкаслской болезни был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2021 г. из проб патологического материала, полученного от кур и поступившего из частного сектора СОО «Аграрник» города Ханты-Мансийск Ханты-Мансийского автономного округа Тюменской области РФ.

Штамм «NDV / chicken / Rus / Khanty-Mansi / 1240-1 / 21» был получен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2022 г. при проведении научно-исследовательской работы путем пассирования выделенного вируса на СПФ-эмбрионах кур методом предельных разведений. Штамм адаптирован к репродукции в 9-11-суточных эмбрионах кур.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Таксономия штамма вируса: сфера *Riboviria*, царство *Orthornavirae*, тип *Negarnaviricota*, подтип *Haploviricotina*, класс *Monjiviricetes*, отряд *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*, подсемейство *Avulavirinae*, род *Orthoavulavirus*, вид *Avian orthoavulavirus 1*.

Депозитарий: Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрвец).

Регистрационный номер: №375 - деп / 22-9 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Дата депонирования штамма: 28 ноября 2022 г.

Срок хранения штамма в депозитории: до 01.2028

Начальник службы безопасности ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Руководитель Всероссийской государственной коллекции
 экзотических типов вируса ящура и других патогенов
 животных ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.Б. Комолёнов

С.А. Похвальный



КОЛИЯ ВЕРНА
 УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
 * ПРОХВАТОВА Л. Б.





Россельхознадзор

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

микрорайон Юрьевец, город Владимир, Владимирская область, Россия, 600901
тел.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

« 06 » 10 2023 г.

СПРАВКА №495 - деп / 23-45

**о депонировании штамма «NDV / chicken / Rus / Ingushetia / 1750 / 20»
вируса ньюкаслской болезни**

Форма депонирования: «Хранение».

Авторы штамма: Гусева Н.А., Жестков П.Д., Зиняков Н.Г., Андриясов А.В., Козлов А.А., Колосов С.Н., Никонова З.Б., Ярославцева П.С., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.

Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вирус ньюкаслской болезни был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2020 г из пробы патологического материала, полученного от курицы и поступившего из личного подсобного хозяйства Арапиева З.М. сельского поселения Кантышево Назрановского района Республики Ингушетия РФ.

Штамм «NDV / chicken / Rus / Ingushetia / 1750 / 20» был получен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2023 г при проведении научно-исследовательской работы путем пассирования выделенного вируса на СПФ-эмбрионах кур методом предельных разведений. Штамм адаптирован к репродукции в 9-11-суточных эмбрионах кур.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Таксономия штамма вируса: сфера *Riboviria*, царство *Orthornavirae*, тип *Negarnaviricota*, подтип *Haploviricotina*, класс *Monjiviricetes*, отряд *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*, подсемейство *Avulavirinae*, род *Orthoavulavirus*, вид *Avian orthoavulavirus 1*.

Депозитарий: Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрьевец).

Регистрационный номер: №495 - деп / 23-45 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Дата депонирования штамма: 28 сентября 2023 г.

Срок хранения штамма в депозитарии: до 01.2029 г.

Начальник службы безопасности ФГБУ «ВНИИЗЖ»:

С.Б. Комолёнов

Руководитель Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ»:

С.А. Похвальный



КОПИЯ ВЕРНА
ЗАМЕЧАТЕЛЬНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



Россельхознадзор

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

микрорайон Юрьевец, город Владимир, Владимирская область, Россия, 600901
тел.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

« 10 » // 2023 г.

**СПРАВКА №500 - деп / 23-50
о депонировании штамма «NDV / chicken / Rus / N.Novgorod / 667 / 21»
вируса ньюкаслской болезни**

Форма депонирования: «Хранение».

Авторы штамма: Гусева Н.А., Жестков П.Д., Никонова З.Б., Андриясов А.В., Зиняков Н.Г., Колосов С.Н., Овчинникова Е.В., Волкова М.А., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.

Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вирус ньюкаслской болезни был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2021 г из пробы патологического материала, полученного от курицы и поступившего из личного подсобного хозяйства Гордеева Н.Н. села Чернышиха Кстовского района Нижегородской области РФ.

Штамм «NDV / chicken / Rus / N.Novgorod / 667 / 21» был получен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2023 г при проведении научно-исследовательской работы путем пассирования выделенного вируса на СПФ-эмбрионах кур методом предельных разведений. Штамм адаптирован к репродукции в 9-11-суточных эмбрионах кур.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Таксономия штамма вируса: сфера *Riboviria*, царство *Orthornavirae*, тип *Negarnaviricota*, подтип *Haploviricotina*, класс *Monjiviricetes*, отряд *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*, подсемейство *Avulavirinae*, род *Orthoavulavirus*, вид *Avian orthoavulavirus 1*.

Депозитарий: Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрьевец).

Регистрационный номер: №500 - деп / 23-50 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Дата депонирования штамма: 10 ноября 2023 г.

Срок хранения штамма в депозитории: до 01.2029 г.

начальник службы безопасности ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.Б. Комолёнов

Руководитель Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.А. Похвальный



КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



Россельхознадзор

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

микрорайон Юрьевец, город Владимир, Владимирская область, Россия, 600901
тел.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

« 06 » 10 2023 г.

СПРАВКА №493 - деп / 23-43

**о депонировании штамма «NDV / chicken / Rus / Bashkortostan / 2776 / 22»
вируса ньюкаслской болезни**

Форма депонирования: «Хранение».**Авторы штамма:** Гусева Н.А., Жестков П.Д., Никонова З.Б., Андриясов А.В., Зиняков Н.Г., Колосов С.Н., Овчинникова Е.В., Волкова М.А., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.**Депозитор:** ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вирус ньюкаслской болезни был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2022 г из пробы патологического материала, полученного от курицы и поступившего из ООО «Стерлибашевская птицеферма» села Стерлибашево Стерлибашевского района Республики Башкортостан РФ.

Штамм «NDV / chicken / Rus / Bashkortostan / 2776 / 22» был получен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2023 г при проведении научно-исследовательской работы путем пассирования выделенного вируса на СПФ-эмбрионах кур методом предельных разведений. Штамм адаптирован к репродукции в 9-11-суточных эмбрионах кур.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Таксономия штамма вируса: сфера *Riboviria*, царство *Orthornavirae*, тип *Negarnaviricota*, подтип *Haploviricotina*, класс *Monjiviricetes*, отряд *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*, подсемейство *Avulavirinae*, род *Orthoavulavirus*, вид *Avian orthoavulavirus 1*.

Депозитарий: Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрьевец).

Регистрационный номер: №493 - деп / 23-43 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».**Дата депонирования штамма:** 28 сентября 2023 г.**Срок хранения штамма в депозитории:** до 01.2029 г.**Начальник службы безопасности ФГБУ «ВНИИЗЖ»**

Руководитель Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.Б. Комолёнков

С.А. Похвальный





Россельхознадзор

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

микрорайон Юрьево, город Владимир, Владимирская область, Россия, 600901
тел.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

« 28 » 09 2023 г.

СПРАВКА №494 - деп / 23-44

**о депонировании штамма «NDV / pigeon / Rus / Tatarstan / 311 / 20»
вируса ньюкаслской болезни для целей патентной процедуры**

Форма депонирования: «Национальное патентное депонирование».

Авторы штамма: Гусева Н.А., Жестков П.Д., Козлов А.А., Зиняков Н.Г., Андриясов А.В., Волкова М.А., Колосов С.Н., Овчинникова Е.В., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.

Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вирус ньюкаслской болезни был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2020 г из пробы патологического материала, полученного от домашнего голубя и поступившего от Сапарова К.М. из поселка Октябрьский Зеленодольского района Республики Татарстан РФ.

Штамм «NDV / pigeon / Rus / Tatarstan / 311 / 20» был получен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2023 г при проведении научно-исследовательской работы путем пассирования выделенного вируса на СПФ-эмбрионах кур методом предельных разведений. Штамм адаптирован к репродукции в 9-11-суточных эмбрионах кур.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Таксономия штамма вируса: сфера *Riboviria*, царство *Orthornavirae*, тип *Negarnaviricota*, подтип *Haploviricotina*, класс *Monjiviricetes*, отряд *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*, подсемейство *Avulavirinae*, род *Orthoavulavirus*, вид *Avian orthoavulavirus 1*.

Депозитарий: Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрьево).

Регистрационный номер: №494 - деп / 23-44 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Дата депонирования штамма: 28 сентября 2023 г.

Срок хранения штамма в депозитории: до 01.2049 г.

Начальник службы безопасности ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.Б. Комолёнков

Руководитель Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.А. Похвальный





Россельхознадзор

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

улица Гвардейская, дом 6, микрорайон Юрьевец, город Владимир, Владимирская область, Россия, 600901
тел.: (4922) 26-06-14, ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

« 30 » 12 2025 г.

**СПРАВКА № 558-деп / 25-36
о депонировании штамма «NDV/quail/Rus/MariEI/128-2/23»
вируса ньюкаслской болезни**

Форма депонирования: «Хранение».

Авторы штамма: Н.А. Гусева, А.А. Щербина, П.Д. Жестков, Н.Г. Зиняков, Л.О. Щербакова, З.Б. Никонова, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала.

Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вирусный изолят «NDV/quail/Rus/MariEI/128-2/23», послуживший источником для получения штамма, был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2023 г. из проб патологического материала от домашнего перепела, поступившего из городского округа «Город Йошкар-Ола» республики Марий Эл РФ.

В результате проведения научно-исследовательской работы путем пассирования выделенного вируса на СПФ-эмбрионах кур методом предельных разведений из аллантоисной жидкости был получен штамм «NDV/quail/Rus/MariEI/128-2/23» вируса болезни Ньюкасла. Штамм адаптирован к репродукции в 9-11 суточных СПФ-эмбрионах кур.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Таксономия штамма вируса: отряд *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*, подсемейство *Avulavirinae*, род *Orthoavulavirus*, вид *Orthoavulavirus javaense*.

Депозитарий: Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ул. Гвардейская, д. 6).

Регистрационный номер: 558-деп / 25-36 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Дата депонирования штамма: 30.12.2025 г.

Срок хранения штамма в депозитарии: до 12.30.35 г.

Руководитель службы безопасности ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Ю. Корниенков

Руководителя Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ»

В.Б. Высоцкий



КОПИЯ ВЕРНА
Заместитель секретаря
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

