

**ОСИПОВА Ольга Сергеевна**

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ  
ПОДТИПА Н9, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ В 2018-2025 ГГ.**

4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных»

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

**Научный руководитель:**

**Чвала Илья Александрович**

кандидат ветеринарных наук

**Официальные оппоненты:**

**Гусев Анатолий Алексеевич,**

член-корреспондент РАН, доктор ветеринарных наук, профессор, научный консультант ООО «Ветпоставка», г. Владимир;

**Тарлавин Николай Владимирович**

кандидат ветеринарных наук, старший преподаватель кафедры Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины", заместитель директора по научной работе ВНИВИП – филиала ФНЦ «ВНИТИП», г. Санкт-Петербург.

**Ведущая организация:**

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»), р. п. Кольцово Новосибирской области.

Защита диссертации состоится 21 мая 2026 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета 36.1.002.01, созданного на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») по адресу: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, ул. Гвардейская 6, тел. 8(4922) 52-99-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ». Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» [www.arriah.ru](http://www.arriah.ru)

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Грипп птиц (ГП) – контагиозная вирусная болезнь птиц, характеризующаяся поражением органов дыхания и пищеварения, протекающая от бессимптомной инфекции до тяжелой генерализованной септицемии [Бессарабов Б. Ф., 2007]. Высокопатогенный грипп птиц, как правило, вызывается подтипами H5 и H7, и относится к заболеваниям, подлежащим обязательному уведомлению во Всемирную организацию здоровья животных (ВОЗЖ). За исключением подтипов (H17 и H18), выделенных от летучих мышей, остальные подтипы вируса (H1-H16 и N1-N9) циркулируют среди птиц и составляют большинство вирусов низкопатогенного гриппа [Tong S., 2013; Malik Y. S., 2021].

Хотя вирусы гриппа А подтипа H9 классифицируются как низковирулентные, их широкое распространение в птицеводстве ряда стран привело к значимому экономическому ущербу из-за снижения яйценоскости и высокой смертности, вызванной коинфекцией с различными патогенами [Arafat N., 2020; Uddin M.M., 2025; Regragui R., 2025]. Циркуляция вирусов гриппа птиц подтипа H9 с другими подтипами может способствовать формированию новых реассортантных вирусов, способных преодолевать межвидовой барьер [Bhat S., 2022; Li Y., 2019]. Среди вирусов гриппа птиц подтипа H9 наиболее распространен подтип H9N2. В настоящее время вирусы H9N2 широко распространены в Африке и Юго-Восточной Азии [Zhou W., 2025; Mosaad Z., 2025; Zhang L., 2025]. В качестве профилактических мероприятий и борьбы с болезнью многие страны внедрили программы вакцинации (Китай, Израиль, Южная Корея, Марокко, Пакистан, Египет, Иран, ОАЭ) [Carnaccini S., 2020]. Применение инактивированных вакцин доказало свою эффективность в снижении тяжести болезни, но не остановило распространение инфекции [Awuni J., 2019; Verhagen J., 2017; Oluwayelu D., 2017; Świątoń E., 2018; Senne D., 2007]. В Российской Федерации (РФ) вирус H9N2 был выявлен в 2012 г. в бройлерном хозяйстве Амурской области и с 2018 года распространился среди птицеводческих предприятий во многих регионах [Волков М. С., 2019].

Традиционно, для диагностики гриппа птиц применяют реакцию торможения гемагглютинации (РТГА). РТГА обладает высокой чувствительностью и достоверно оценивает уровень специфических антител в сыворотке крови больных или вакцинированных птиц, а также позволяет обнаружить и идентифицировать гемагглютинирующий агент при его выделении. В настоящее время в РФ известны тест-системы для диагностики гриппа птиц, основанные на непрямом варианте иммуноферментного анализа (ИФА) и РТГА. В отличие от РТГА, ИФА позволяет выявить антитела, общие для всех штаммов вируса гриппа типа А [Троценко Н. И., 2006; Ji P., 2022; Wang G., 2012]. В связи с распространением низкопатогенного гриппа

птиц, вызванного вирусом H9N2 в популяциях сельскохозяйственной и дикой птицы на территории РФ, необходима разработка диагностической тест-системы на основе современного штамма. Изучение биологических свойств вирусов, распространенных в РФ, их сравнение с другими выделенными в мире изолятами, является актуальным и имеет практический интерес.

**Степень разработанности проблемы.** Большая часть научных публикаций о низкопатогенном гриппе птиц подтипа H9 обусловлена широким распространением вирусов, особенно в странах Азии, Ближнего Востока, Африки, где они наносят существенный экономический ущерб птицеводческой отрасли [Peacock T., 2019; Alexander D., 2007; Suares D.L., 2008; Capua I., 2009; Jiang W., 2012; Oluwayelu D., 2017; Iqba M., 2013; Spackman E., 2014; Nagy, A. 2017; Spackman E., 2020; Suarez D., 2008]. Появление вируса гриппа птиц подтипа H9 в Китае способствовало их большому филогенетическому разнообразию. Особый интерес ученых связан с выявлением вирусов, обладающих пандемическим потенциалом [Zhou W., 2025; Dai M., 2021; Hao X., 2020; Xu K.M., 2007; Li Y., 2019; Song W., 2020]. Работы отечественных ученых: Львов Д.К., Сюрин В.Н., Волков М.С., Марченко В.Ю., Варкентин А.В. и других авторов посвящены эпизоотологическим данным, профилактике и мерам борьбы с гриппом птиц [Варкентин А. В., 2014; Сюрин В.Н., 2001; Волков М.С., 2019; Львов Д. К., 2013; Марченко В.Ю., 2019].

Изучение биологических свойств вновь выделенных вирусов на территории РФ позволяет актуализировать информацию о циркуляции гриппа и генетической изменчивости, а также эволюции вируса. Одним из перспективных направлений является совершенствование диагностических тест-систем на основе актуального штамма вируса.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы являлось изучение биологических свойств вирусов гриппа птиц подтипа H9, выделенных на территории Российской Федерации в 2018-2025 гг., и получение актуального штамма для усовершенствования диагностических средств.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- 1) выявить вирус гриппа птиц подтипа H9 в пробах биологического материала разных видов птиц, провести выделение вирусов;
- 2) определить нуклеотидные последовательности гена гемагглютинина и полногеномных структур выделенных вирусов, провести их анализ;
- 3) изучить биологические свойства выбранных изолятов с помощью вирусологических и серологических методов;

4) отобрать вирусы для использования в качестве антигена для изготовления иммуноспецифических компонентов, входящих в состав тест-системы на основе реакции торможения гемагглютинации;

5) провести сравнительную оценку эффективности выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 в пробах сывороток крови разных видов птиц.

**Научная новизна.** Изучены биологические свойства изолятов H9N2, выделенных в 2018-2025 гг.

Установлена филогенетическая принадлежность вирусов H9N2, выделенных на территории Российской Федерации, к разным генетическим группам.

Впервые определены полногеномные последовательности выбранных изолятов H9N2, которые могут быть использованы для изучения молекулярно-биологических свойств и эволюции вируса гриппа птиц, а также при изготовлении средств специфической профилактики и диагностики.

Изучены вирулентные свойства и получены данные о клеточно-опосредованном иммунном ответе цыплят после экспериментального заражения вирусами H9N2.

Отобраны и депонированы наиболее антигенно выделенные изоляты, которые могут быть использованы в качестве штаммов-кандидатов при создании или усовершенствовании средств специфической профилактики или диагностики.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Определены и проанализированы полные нуклеотидные последовательности генов PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, MP и NS изолята A/chicken/Tajikistan/2379/2018, представлены в базе данных GenBank (MW786964-MW786971) и платформе GisAid (EPI1905101-EPI1905108).

Получены патенты на изобретение Российской Федерации (в соавторстве) № RU 2736786 C1 от 20.11.2020 на штамм A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2 и № RU 2767359 C1 от 17.03.2022 на штамм A/chicken/Chelyabinsk/314-1/2020 H9N2 для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики гриппа птиц подтипа H9.

Получен патент на изобретение Российской Федерации (в соавторстве) № RU 2738900 C1 от 2020-12-18 «Диагностический набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 в реакции торможения гемагглютинации» с высокой специфичностью, чувствительностью, воспроизводимостью и правильностью результатов, что позволяет использовать его для проведения мониторинговых исследований, оценки иммунного статуса птицы и контроля напряженности поствакцинального иммунитета.

Штаммы A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2, A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 H9N2, A/chicken/Zabaikal/2137/2019 H9N2 и A/chicken/Chelyabinsk/314-1/2020 H9N2

охарактеризованы и депонированы во Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ».

**Методология и методы исследований.** Методология проведенных исследований включает стандартные процедуры с использованием различных материалов и естественно восприимчивых животных. В работе использовали вирусологические, молекулярно-генетические, серологические, физико-химические и иммунологические методы.

**Положения, выносимые на защиту:**

- результаты изучения биологических свойств изолятов вируса H9N2, полученных в 2018-2025 гг.;
- получение иммуноспецифических компонентов набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 в реакции торможения гемагглютинации (лиофилизированные препараты антигена и гипериммунной сыворотки);
- определение основных валидационных характеристик разработанного «Набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 в реакции торможения гемагглютинации» (специфичность и чувствительность).

**Степень достоверности и апробации результатов.** Представленные в диссертационной работе результаты получены при использовании стандартного лабораторного оборудования и утвержденных методик. Работа выполнена на достаточном количестве экспериментального материала. Степень достоверности проведенных исследований подтверждена комиссионными и валидационными испытаниями, статистической обработкой данных. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях методической комиссии и Ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» в период с 2018 по 2025 гг., а также на 11 международных и всероссийских научных и научно-практических конференциях.

По материалам диссертационной работы опубликованы 24 научные работы, из них пять - в рецензируемых научных изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, и три патента Российской Федерации на изобретение.

**Личный вклад соискателя.** Основной объем исследований выполнен автором самостоятельно. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.в.н. Чвала И.А., д.б.н. Мудрак Н.С, за консультативную и практическую помощь в проведении отдельных этапов работы к.б.н. Волковой М.А., к.б.н. Зинякову Н.Г., к.б.н. Андриясову А.В., к.б.н. Сосипаторовой В.Ю., к.б.н. Чвала Ир.А., к.б.н. Ярославцевой П.С, к.б.н. Андрейчуку Д.Б. и всему коллективу референтной лаборатории вирусных болезней птиц за методическую помощь при выполнении отдельных этапов работы.

## 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали следующие материалы и методы.

### 2.1 Материалы

**Вирус.** Изоляты, выделенные из проб биоматериала от диких и домашних птиц, разных регионов РФ и Республики Таджикистан: «A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2», A/chicken/Primorsk/3124/2018 H9N2 «A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 H9N2», «A/chicken/Zabaikal/2137/2019 H9N2», «A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2», «A/chicken/Chelyabinsk/314-1/2020 H9N2».

**Куриные эмбрионы.** 9-12-суточные эмбрионы СПФ-кур (СПФ-КЭ) фирмы «Valo Biomedica» (Германия) и Venky's India Limited (Индия).

**Лабораторные животные.** Клинически здоровые невакцинированные против ГП 6-недельные цыплята яичного направления и 6-8-недельные СПФ-цыплята.

**Наборы, реактивы и специфические компоненты.** Набор для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия); для постановки ПЦР - компоненты производства «Синтол» (Россия); системы праймеров и зондов для выявления РНК вируса ГП и идентификации подтипов H9 и N2 («Синтол», Россия); набор для секвенирования BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems); для РТГА и РТНА - референтные антигены и сыворотки H1-H16 производства IZSve (Италия) и GD (Нидерланды); набор для выявления антител к вирусу ГП подтипа H5 в РТГА (ФГБУ «ВНИИЗЖ»); набор для выявления антител к вирусу ГП подтипа H9 в реакции торможения гемагглютинации (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), набор для выявления антител к вирусу ГП иммуноферментным методом при тестировании проб в одном разведении (ФГБУ «ВНИИЗЖ»); меченые моноклональные антитела CD45-FITC, CD4-PE, CD8 $\alpha$ -PE, CD3-PE и Bu1a-PE (Southern biotech, США).

### 2.2 Методы исследований

**Выделение и идентификацию вируса** проводили с использованием 9-11 суточных СПФ-КЭ. Отобранную экстраэмбриональную жидкость (ЭЭЖ) с титром в реакции гемагглютинации  $4,0 \log_2$  и выше использовали в РТГА и РТНА со специфическими сыворотками [МУ, 2015].

**Определение титра инфекционной активности** проводили по методу Кербера с использованием 10-кратных последовательных разведений вирусосодержащего материала и выражали в единицах ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> [Белоусова Р.В., 2006].

**Определение вирулентности вирусов гриппа птиц** согласно «Методическим указаниям по определению индекса патогенности штаммов вируса гриппа А птиц», утвержденным в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [МУ, 2015].

**Молекулярно-генетические методы.** Выделение суммарной РНК, ОТ-ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР проводили с использованием набора «Рибо-преп» и компонентов компании «Синтол» согласно инструкции производителя.

Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена НА осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 с использованием наборов GenSeq-100 согласно инструкции производителя.

Полногеномное секвенирование осуществляли на автоматическом секвенаторе MiSeq (Illumine) согласно инструкции производителя. Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение GS De Novo Assembler, GS Reference Mapper (Roche, Германия), специальный пакет программ Sam Tools, Bowtie, Tablet (<http://sourceforge.net/>).

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit, версия 7.0.5.3. Выравнивали последовательности с помощью программы ClustalW. Использовали нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов А/Н9, опубликованные в GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/)). Построение филогенетического дерева осуществляли с помощью алгоритма NJ в реализации пакета MEGA, версия 6.06.

**Титры антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови птиц** определяли в РТГА согласно инструкции производителя.

**Экспериментальное заражение** проводили с использованием цыплят яичного кросса 30-суточного возраста, не имеющих антител к вирусу гриппа птиц.

**Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов** проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (США). Обработывали результаты с помощью программного обеспечения Cell Quest Pro 1.0.

### **2.3 Результаты собственных исследований**

**Выделение вирусов гриппа птиц подтипа Н9.** В референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2018-2025 гг. было исследовано 58544 пробы внутренних органов, трахеальных и клоакальных мазков от домашних и диких птиц из 69 регионов Российской Федерации и Республики Таджикистан. В ОТ-ПЦР-РВ генетический материал вируса гриппа типа А был выявлен в 1570 пробах биологического материала, вирус Н9N2 идентифицирован в 77 пробах. Положительные в ОТ-ПЦР-РВ образцы суспензий биоматериалов инокулировали в аллантоисную полость 9-11-суточным куриным эмбрионам. После проведения трех последовательных пассажей было выделено 15 изолятов Н9N2. Для всех изолятов определяли инфекционную и гемагглютинирующую активность. Результаты представлены в таблице 1. Идентификация выделенных вирусов в РТГА и в РТНА с иммуноспецифическими компонентами производства Istituto Zooprofilattico

Sperimentale delle Venezie (IZSVE, Италия) подтвердила принадлежность выделенных патогенов к подтипу H9N2.

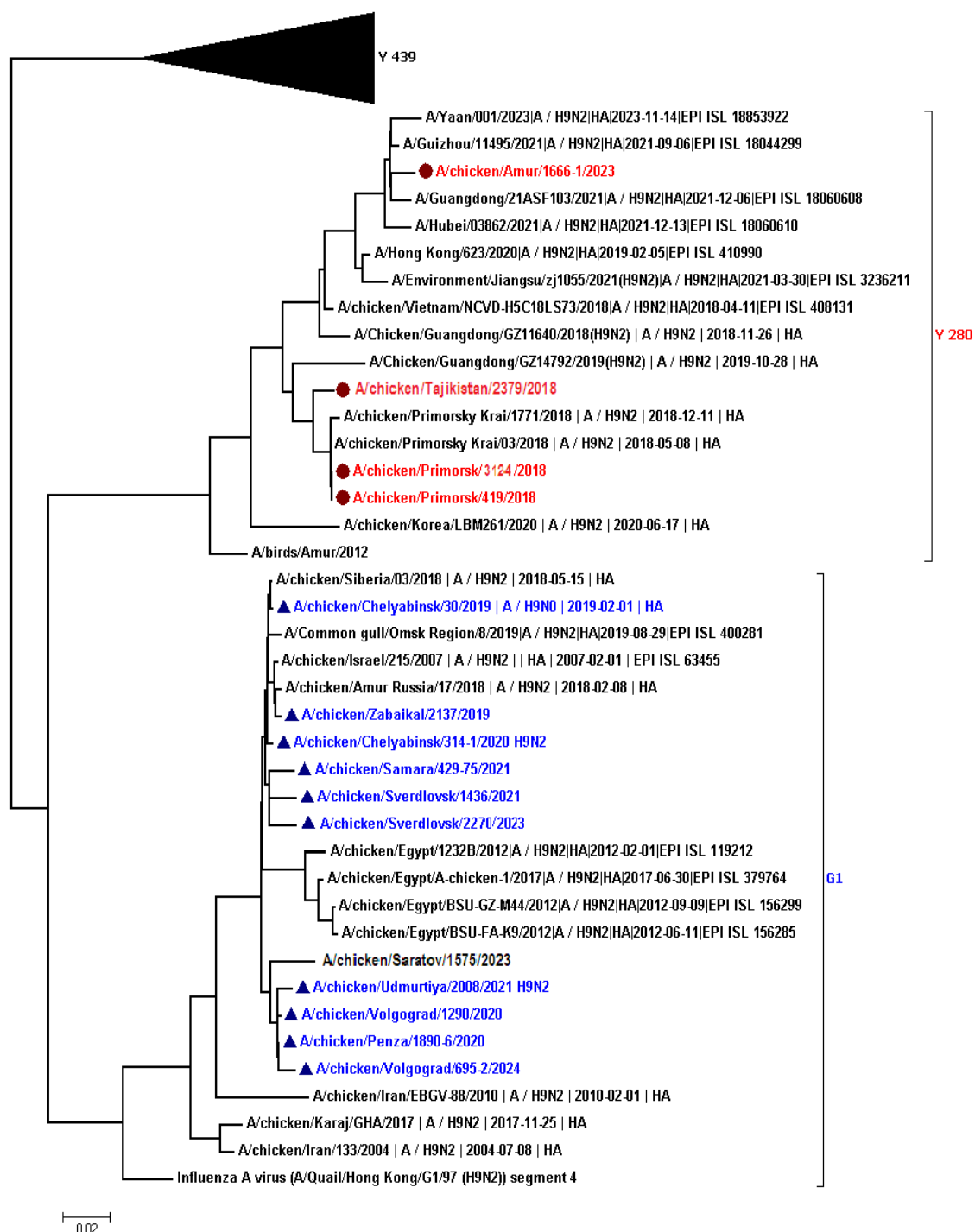
**Молекулярно-генетические свойства выделенных вирусов.** Нуклеотидные последовательности фрагмента гена НА вирусов, выявленных в 2018-2025 гг. сравнивали с последовательностями изолятов низкопатогенного гриппа птиц подтипа А/Н9, опубликованных в международной базе данных GenBank.

**Таблица 1 – Выделенные вирусы H9N2**

| №  | Федеральный округ РФ/ страна | Название изолята                      | Средний титр гемагглютинирующей активности, lg ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> (n=3) | Средний титр инфекционной активности, lg ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> (n=3) |
|----|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Южный                        | A/chicken/Volgograd/1290/2020 H9N2    | 8,0±0,00                                                                                | 9,3±0,12                                                                          |
| 2  |                              | A/chicken/Volgograd/695-2/2024 H9N2   | 9,0±0,00                                                                                | 9,20±0,12                                                                         |
| 3  | Северо-Кавказский            | A/chicken/Dagestan/4633/2019 H9N2     | 7,0±0,00                                                                                | 8,3±0,12                                                                          |
| 4  | Приволжский                  | A/chicken/Penza/1890/2020 H9N2        | 7,0±0,00                                                                                | 7,25±0,12                                                                         |
| 5  |                              | A/chicken/Samara/429/2021 H9N2        | 6,3±0,33                                                                                | 7,2±0,12                                                                          |
| 6  |                              | A/chicken/Udmurtiya/2008/2021 H9N2    | 7,7±0,33                                                                                | 8,7±0,12                                                                          |
| 7  | Уральский                    | A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2    | 8,0±0,00                                                                                | 8,5±0,12                                                                          |
| 8  |                              | A/chicken/Chelyabinsk/314-1/2020 H9N2 | 8,3±0,33                                                                                | 8,2±0,12                                                                          |
| 9  |                              | A/chicken/Sverdlovsk/1436/2021 H9N2   | 6,7±0,33                                                                                | 7,2±0,12                                                                          |
| 10 |                              | A/chicken/Sverdlovsk/2270/2023 H9N2   | 7,3±0,33                                                                                | 7,5±0,12                                                                          |
| 11 | Сибирский                    | A/chicken Zabaikal/2137/2019 H9N2     | 8,0±0,00                                                                                | 10,13±0,12                                                                        |
| 12 | Дальневосточный              | A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2      | 9,3±0,33                                                                                | 10,13±0,12                                                                        |
| 13 |                              | A/chicken/Primorsk/3124/2018 H9N2     | 7,3±0,33                                                                                | 8,75±0,14                                                                         |
| 14 |                              | A/chicken/Amur/1666/2023 H9N2         | 8,0±0,00                                                                                | 7,25±0,13                                                                         |
| 15 | Респ. Таджикистан            | A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 H9N2  | 8,3±0,33                                                                                | 8,25±0,13                                                                         |

В результате филогенетического анализа вирусы, выявленные в 2018-2023 гг. на территории Дальневосточного ФО РФ и Республики Таджикистан, были отнесены к линии Y280 и имели генетическое сходство (99-100%) с изолятами H9N2, выделенными в странах Восточной (Китай, Южная Корея) и Юго-Восточной Азии (Лаос, Малайзия). Вирусы H9N2, выявленные в 2019-2024 гг. на птицекомплексах

Южного, Приволжского, Уральского и Сибирского ФО РФ принадлежали к генетической линии G1 и филогенетически имели близкое родство с изолятами H9N2, выявленными в 2007-2010 гг. на территории стран Ближнего Востока (Израиль, Египет, Иран) и в Пакистане (рисунок 1).



**Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена HA (1-1539 п.н. ОРС) вируса H9N2.**

Были отмечены случаи выявления представителей корейской группы Y439 в пробах биоматериала от диких уток из Амурской области в 2018 г. и Владимирской области в 2021 г.

Вирусы, выявленные на территории Дальнего Востока и Республики Таджикистан, продемонстрировали генетические отличия от штамма A/chicken/Amursky/03/12/H9N2, выделенного в 2012 г. в промышленном птицеводстве Амурской области, что послужило основанием для дальнейшего исследования с целью актуализации производственных штаммов.

В результате проведенного нами полногеномного секвенирования и последующего анализа полученных данных было выявлено, что вирусы генетической линии Y280 (A/chicken/Primorsk/419/2018, A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 и A/chicken/Amur/1666/23) относились к доминирующему на территории Китая генотипу G57. Согласно классификации Li Y. et al. анализируемые вирусы распределялись по кладам следующим образом: ген PB2 клада 8, ген PB1 клада 5, ген PA клада 7, ген HA клада 15, ген NP клада 6, ген NA клада 2, ген M клада 3, ген NS клада 7 [Li Y., 2019]. Генотип G57 стал доминирующим на территории Китая и было показано его активное участие в геномной реассортации с вирусами других подтипов таких как H7N9, H5N2, H7N7 и H10N8 [Zhou Y., 2024].

Проведенный полногеномный анализ нуклеотидных последовательностей вирусов A/chicken/Chelyabinsk/30/2019, A/chicken/Chelyabinsk/314-1/2020 и A/chicken/Zabaikal/2137/2019 показал родство с группой изолятов, выявленных ранее на территории Израиля, относящихся к генетической линии G1. Высокий уровень генетического сходства по всем сегментам генома вирусов A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 и A/chicken/Chelyabinsk/314-1/2020 указал на отсутствие реассортации с вирусами гриппа других подтипов, ранее обнаруженных на территории РФ. Анализ аминокислотной последовательности белка HA изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 выявил аминокислотные замены на участке рецептор связывающего домена позиции 160, 181, 226, 227 (по нумерации H3). Т.Р. Реасокк показал, что замена Q226L способствует взаимодействию вируса гриппа с рецепторами клеток дыхательных путей млекопитающих [Reasock T.P., 2019].

**Вирулентные свойства выделенных вирусов.** Оценку вирулентных свойств, выбранных в результате филогенетического анализа изолятов H9N2, проводили с помощью определения индекса патогенности при внутривенном заражении цыплят (IVPI). Результаты наблюдения клинического состояния птицы и полученные значения индексов патогенности представлены в таблице 2.

После инфицирования у некоторых цыплят наблюдали слабо выраженные признаки заболевания (угнетение, взъерошенность оперения, диарея). Инкубационный период болезни длился не менее 3 суток.

**Таблица 2 - Оценка клинического состояния цыплят после заражения и полученные индексы патогенности (IVPI)**

| Название<br>изолята H9N2/<br>генетическая линия | Клиническое<br>состояние<br>цыплят | Период<br>наблюдений, сут |   |   |          | индекс<br>патогенности<br>IVPI |
|-------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|---|---|----------|--------------------------------|
|                                                 |                                    | 1                         | 2 | 3 | 4-<br>10 |                                |
| A/chicken/Primorsk/419/2018<br>(Y280)           | Здоровые                           | 10                        | 8 | 8 | 8        | <b>0,14</b>                    |
|                                                 | Больные                            | 0                         | 2 | 2 | 2        |                                |
|                                                 | Тяжелобольные                      | 0                         | 0 | 0 | 0        |                                |
|                                                 | Погибшие                           | 0                         | 0 | 0 | 0        |                                |
| A/chicken/Tadjikistan/2379/2018<br>(Y280)       | Здоровые                           | 10                        | 9 | 9 | 9        | <b>0,12</b>                    |
|                                                 | Больные                            | 0                         | 1 | 1 | 1        |                                |
|                                                 | Тяжелобольные                      | 0                         | 0 | 0 | 0        |                                |
|                                                 | Погибшие                           | 0                         | 0 | 0 | 0        |                                |
| A/chicken/Zabaikal/2137/2019<br>(G1)            | Здоровые                           | 10                        | 9 | 9 | 10       | <b>0,02</b>                    |
|                                                 | Больные                            | 0                         | 1 | 1 | 0        |                                |
|                                                 | Тяжелобольные                      | 0                         | 0 | 0 | 0        |                                |
|                                                 | Погибшие                           | 0                         | 0 | 0 | 0        |                                |
| A/chicken/Chelyabinsk/314-<br>1/2020<br>(G1)    | Здоровые                           | 10                        | 9 | 9 | 10       | <b>0,02</b>                    |
|                                                 | Больные                            | 0                         | 1 | 1 | 0        |                                |
|                                                 | Тяжелобольные                      | 0                         | 0 | 0 | 0        |                                |
|                                                 | Погибшие                           | 0                         | 0 | 0 | 0        |                                |

Таким образом, индексы патогенности испытуемых изолятов имели значения от 0,02 до 0,14, что охарактеризовало их как низковирулентные. На основании анализа предсказанной аминокислотной последовательности сайт нарезания гемагглютинина вирусов H9N2 имел сходную структуру, содержащую 6 основных аминокислот RSS(R/G)LF. В результате испытуемые изоляты H9N2 согласно «Руководству по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных» ВОЗЖ были отнесены к вирусам низкопатогенного гриппа птиц [Глава 3.3.4. ВОЗЖ].

**Изучение гуморальных и клеточных факторов иммунного ответа при инфицировании цыплят.** Для определения субпопуляций Т-лимфоцитов при заражении низковирулентным вирусом H9N2 был проведен опыт, в котором использовали вирусы генетических линий Y-280 (A/chicken/Tadjikistan/2379/2018, A/chicken/Primorsk/419/2018) и G1 (A/chicken/Chelyabinsk/30/2019). Сформировали четыре группы 30-суточных цыплят яичного кросса, не имеющих антител к вирусу гриппа птиц. Цыплят разделили на 4 группы по 5 голов в каждой и содержали в изолированных боксах в течении 15 суток. Вируссодержащую экстраэмбриональную жидкость (ЭЭЖ) с инфекционной активностью  $10^6$  ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> вводили цыплятам трех

групп внутримышечно в объеме 0,5 см<sup>3</sup>. Цыплятам контрольной группы в том же объеме вводили ФБР. Исследование сывороток крови, полученных до заражения и через 14 суток после заражения, на наличие антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 проводили в РТГА. Результаты исследований представлены в таблице 3.

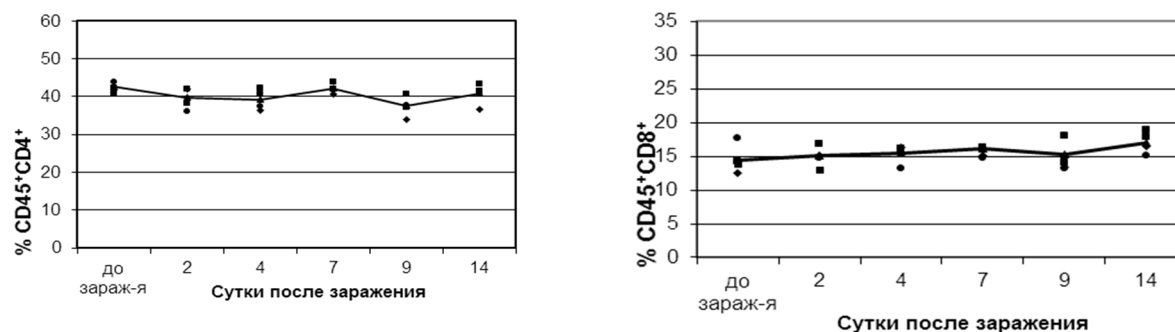
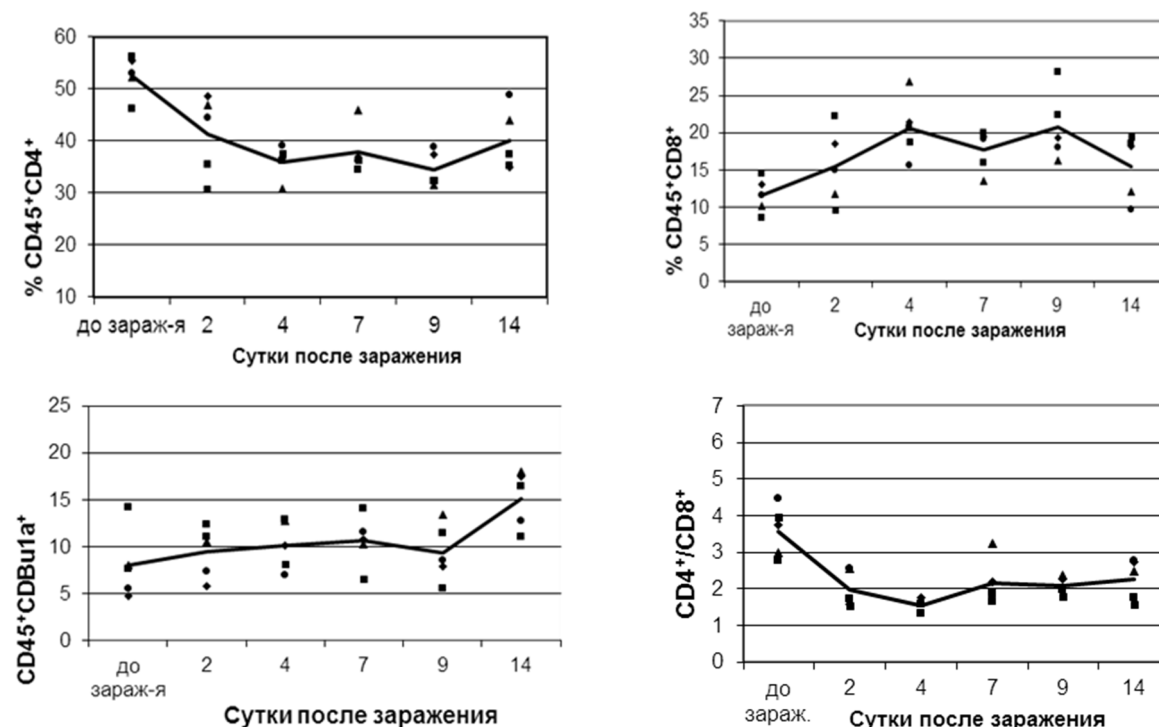
У цыплят инфицированных групп на 14 суток после заражения среднее значение титра антител в РТГА было выше 6 log<sub>2</sub>. У цыплят контрольной группы антитела к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 не выявлены. Высокий уровень специфических антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 у инфицированных цыплят показал развитие выраженного постинфекционного гуморального иммунного ответа.

**Таблица 3 – Титры антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в РТГА**

| Изолят                              | До заражения                 | 14 сут. после заражения      |                                             |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------|
|                                     | Всего проб/<br>положительных | Всего проб/<br>положительных | Средний титр<br>антител (log <sub>2</sub> ) |
| A/chicken/Tadjikistan/2379/<br>2018 | 5/0                          | 5/5                          | 8,7±0,3                                     |
| A/chicken/Primorsk/419/<br>2018     | 5/0                          | 5/5                          | 8,1±0,4                                     |
| A/chicken/Chelyabinsk/30/<br>2019   | 5/0                          | 5/5                          | 6,9±0,4                                     |
| Всего:                              | 15/0                         | 15/15                        | 7,9±0,3                                     |

В результате количественного анализа субпопуляций Т-лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) методом проточной цитофлуориметрии в крови цыплят через 2-4 суток после инфицирования регистрировали значительное снижение процента CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Т-хелперов) и увеличение процента CD45<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> цитотоксических клеток (рисунок 2). У цыплят контрольной группы в популяциях клеток Т-лимфоцитов существенных изменений не регистрировали.

Нормализацию объёма обеих субпопуляций Т-лимфоцитов у заражённых цыплят регистрировали к 14 суткам после заражения. Развитие инфекционного процесса оказывало супрессивное влияние на иммунную систему заражённых цыплят. Полученные результаты о снижении относительной концентрации Т-хелперов в периферической крови после инфекции подтверждают данные исследователей Dai et al., 2021. Иммунная супрессия выражалась в том числе снижением отношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> в Т-лимфоцитах крови через 4 суток после заражения. Через 9 суток после заражения наблюдали увеличение уровня Т-хелперов. К 14 суткам после заражения показатель CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> вновь увеличивался, но в среднем по группам его величина оставалась в 1,3-1,6 раза меньше первоначальных значений. При изучении динамики относительного количества Т и В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят установлено снижение относительного количества Т-лимфоцитов и увеличение относительного количества В-лимфоцитов в крови.

**контроль*****A/chicken/Chelyabinsk/30/2019***

**Рисунок 2. Динамика уровня субпопуляций Т и В-лимфоцитов и динамика отношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> в крови цыплят после заражения изолятом *A/chicken/Chelyabinsk/30/2019*.**

Примечание: Сплошная линия - среднее арифметическое значение по группе из 5 цыплят. Отдельные символы представляют процентное количество клеток для каждой птицы из группы.

Таким образом, в опыте исследовали ключевые факторы иммунного ответа цыплят, инфицированных вирусами H9N2 из разных генетических линий. Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови цыплят, заражённых тремя изолятами вируса H9N2, показал наличие изменений, вызванных вирусной инфекцией – снижение относительного количества Т-лимфоцитов в крови, существенное изменение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в сторону уменьшения процента CD4<sup>+</sup> клеток и увеличения процента CD8<sup>+</sup> клеток и как следствие снижение отношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. При изучении динамики относительного

количества Т и В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят установлено снижение относительного количества Т-лимфоцитов и увеличение относительного количества В-лимфоцитов в крови. Результаты серологических исследований в РТГА показали выраженный гуморальный иммунный ответ. При изучении иммунитета существенных различий между тремя разными изолятами подтипа Н9 низкопатогенного гриппа птиц в гуморальном и клеточном ответе не обнаружили.

**Определение антигенной активности изолятов Н9Н2.** В результате филогенетического анализа нами были выбраны изоляты для определения антигенных свойств вируса Н9Н2 из генетической линии G1 (A/chicken/Chelyabinsk/30/2019) и Y280 (A/chicken/Amursky/03/12, A/chicken/Primorsk/419/2018, A/chicken/Primorsk/3124/2018 и A/chicken/Tadjikistan/2379/2018).

Определение антигенной активности проводили при помощи гипериммунизации 40-суточных цыплят яичного кросса. Инактивированными препаратами, эмульгированными в масляном адьюванте Монтанид ИЗА-70 (Франция) в соотношении 30/70, иммунизировали 40-суточных цыплят яичного кросса. Препарат в дозе  $10^6$  ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> вводили внутримышечно в объёме 1,0 см<sup>3</sup>. В каждой группе было по 10 цыплят. Цыплятам контрольной группы вводили ФБР в объёме 1,0 см<sup>3</sup>. Иммунизацию проводили двукратно в 14 и 28 суток. Пробы крови отбирали у цыплят с интервалом в 7 суток. Специфическую активность полученных гипериммунных сывороток исследовали в РТГА (таблица 4).

**Таблица 4 - Титр антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови иммунизированных кур в РТГА**

| Изоляты, используемые для иммунизации | Период после иммунизации/<br>Средний титр антител в РТГА, log <sub>2</sub> (n=10) |          |          |          |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
|                                       | Опытная группа                                                                    |          | Контроль |          |
|                                       | 14 сутки                                                                          | 28 сутки | 14 сутки | 28 сутки |
| A/chicken/Primorsk/419/2018           | 3,1±0,23                                                                          | 7,3±0,44 | ≤2,0     | ≤2,0     |
| A/chicken/Amursky/03/12               | 3,0±0,56                                                                          | 6,4±0,34 | ≤2,0     | ≤2,0     |
| A/chicken/Primorsk/3124/2018          | 2,3±0,44                                                                          | 7,2±0,29 | ≤2,0     | ≤2,0     |
| A/chicken/Tadjikistan/2379/2018       | 2,1±0,23                                                                          | 6,6±0,42 | ≤2,0     | ≤2,0     |
| A/chicken/Chelyabinsk/30/2019         | 2,6±0,44                                                                          | 6,2±0,34 | ≤2,0     | ≤2,0     |

Примечание: титр антител «≤2,0 log<sub>2</sub>» – отрицательный результат

Специфичность антигенов подтвердили в РТГА с моноспецифическими сыворотками к 16 подтипам вируса гриппа птиц по гемагглютинирующему и с сыворотками крови к другим гемагглютинирующим вирусам (НБ, МГ, МС, ССЯ-76) с использованием диагностических наборов производства «Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie» (IZSVe, Италия) и ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Россия). В качестве отрицательного контроля использовали нормальную сыворотку крови кур (IZSVe, Италия) (таблица 5).

**Таблица 5 - Определение типовой специфичности по гемагглютинирующим свойствам испытуемых изолятов H9N2 в РТГА**

| Сыворотки            | Титр с гомологичным антигеном, $\log_2$ (n=3) |                | Результат реакции с испытуемым изолятом/<br>Средний титр антител, $\log_2$ (n=3) |                                 |                                      |                                             |                                       |
|----------------------|-----------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|
|                      | Контроль                                      |                | A/chicken/<br>Primorsk/<br>419/<br>2018                                          | A/chicken/<br>Amursky/<br>03/12 | A/chicken/<br>Primorsk/<br>3124/2018 | A/chicken/<br>Tadjikistan<br>/2379/<br>2018 | A/chicken/<br>Chelyabinsk/<br>30/2019 |
|                      | Отрицательный                                 | Положительный  |                                                                                  |                                 |                                      |                                             |                                       |
| H1-H8,<br>H10-H16    | $\leq 2,0$                                    | $7,3 \pm 0,33$ | $\leq 2,0$                                                                       | $\leq 2,0$                      | $\leq 2,0$                           | $\leq 2,0$                                  | $\leq 2,0$                            |
| H9N2                 | $\leq 2,0$                                    | $8,7 \pm 0,33$ | $8,3 \pm 0,33$                                                                   | $6,7 \pm 0,00$                  | $6,7 \pm 0,33$                       | $7,7 \pm 0,33$                              | $7,3 \pm 0,33$                        |
| НБ, ССЯ-76,<br>МГ,МС | $\leq 2,0$                                    | $7,0 \pm 0,00$ | $\leq 2,0$                                                                       | $\leq 2,0$                      | $\leq 2,0$                           | $\leq 2,0$                                  | $\leq 2,0$                            |

Примечание: титр антител « $\leq 2,0 \log_2$ » – отрицательный результат

Гемагглютинирующая активность испытуемых образцов в РТГА подавлялась специфической сывороткой к вирусу гриппа подтипа Н9, что подтверждает принадлежность испытуемых изолятов к вирусу гриппа птиц подтипа Н9. Препарат антигена, полученного из изолята A/chicken/Primorsk/419/2018, показал наибольшую активность.

#### **Получение специфических компонентов для использования в наборе для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в РТГА**

**Выбор штамма для использования его в качестве антигена.** В результате анализа биологических свойств выделенных вирусов для использования в качестве антигена в разрабатываемом наборе был выбран изолят «A/chicken/Primorsk/419/2018». По результатам комиссионной проверки штамм депонирован во Всероссийскую коллекцию экзотических штаммов вируса ящура и других микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ».

**Получение специфических компонентов набора (антигена и контрольных сывороток крови).** Инактивированный 0,1% раствором  $\beta$ -пропиолактона очищенный антиген с гемагглютинирующей активностью в РГА  $10,0 \log_2$  после добавления стабилизаторов разливали по стерильным флаконам и высушивали в лиофильной сушке. Гемагглютинирующая активность лиофилизированного антигена составила  $9,0 \log_2$ . Специфичность препарата антигена после лиофилизации проверяли в РТГА с гомо- и гетерологичными сыворотками крови птиц производства Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe, Италия), Института Royal GD (GD, Нидерланды) и ФГБУ «ВНИИЗЖ». Полученный лиофилизированный препарат антигена реагировал только со специфической сывороткой крови, содержащей антитела к вирусу ГП подтипа Н9.

В качестве положительного контроля использовали специфическую к вирусу ГП подтипа Н9 сыворотку крови кур. Для иммунизации 40-60-суточных кур, не имеющих антител к вирусу ГП, использовали очищенную инактивированную вируссодержащую суспензию, эмульгированную с равным объёмом адъюванта Монтанид ИЗА-70 (Франция). Препарат в дозе  $10^6$  ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> вводили внутримышечно в объёме/ 1,0 см<sup>3</sup>. Иммунизацию кур проводили двукратно с интервалом 14 суток. Нормальную сыворотку крови кур, которую получали путём обескровливания здоровой птицы, не имеющей антител к вирусу ГП. Активность и специфичность полученных контрольных сывороток после лиофилизации проверяли в РТГА с гомо- и гетерологичными антигенами производства IZSve (Италия), GD (Нидерланды) и ФГБУ «ВНИИЗЖ». Активность полученной инактивированной лиофилизированной гипериммунной сыворотки в РТГА со специфическим антигеном вируса ГП подтипа Н9 составила  $8,3 \pm 0,33 \log_2$ . Активность отрицательной контрольной сыворотки показала отрицательный результат для всех антигенов.

#### **Определение основных валидационных характеристик разрабатываемого набора**

Для определения специфичности разрабатываемого набора сыворотки крови от невакцинированных СПФ-цыплят 3-недельного возраста исследовали в РТГА с использованием антигена из тестируемого набора и антигенов производства IZSve (Италия) и GD (Нидерланды). Ранее сыворотки были проверены в ИФА с помощью диагностического набора производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Метод РТГА со всеми испытуемыми антигенами показал 100%-ю специфичность. Также для подтверждения специфичности тестируемого набора использовали специфические сыворотки крови кур к гемагглютинирующим вирусам ньюкаслской болезни, ССЯ-76, ГП подтипов Н1-Н16 IZSve (Италия) и GD (Нидерланды) и микоплазм. Активность антигена вируса ГП подтипа Н9 с гетерологичными сыворотками не превышала фоновый уровень (реакция с неиммунной сывороткой). Гомологичные сыворотки крови кур к вирусу ГП подтипа Н9 различных производителей показали положительный результат.

Для определения чувствительности сравнивали результаты выявления антител к вирусу ГП подтипа Н9 в 3772 сыворотках крови цыплят из птицевладельцев РФ Амурской области и Приморского края, иммунизированных против ГП подтипа Н9, и 125 сывороток крови от не вакцинированных птиц в РТГА с применением антигена из тестируемого набора и референтным образцом антигена GD (Нидерланды). Птицы были привиты в суточном возрасте, пробы для исследования отбирали через 30-35 суток после вакцинации. Все пробы были исследованы в ИФА с использованием «Набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц при тестировании сывороток крови в одном разведении» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). В результате параллельного

исследования сывороток крови вакцинированных и невакцинированных кур на наличие антител к вирусу ГП подтипа Н9 разработанный набор показал высокую диагностическую чувствительность и специфичность (таблица 6 и 7).

**Таблица 6 – Выявление антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови от вакцинированных и не вакцинированных цыплят**

| Образец                               | Количество положительных результатов/количество исследованных проб |                                      |                      |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
|                                       | РТГА с антигеном Н9 (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)                                | РТГА с антигеном Н9 (GD, Нидерланды) | ИФА, (ФГБУ «ВНИИЗЖ») |
| Сыворотки от вакцинированных цыплят   | 3697/3772                                                          | 3658/3772                            | 3696/3772            |
| Сыворотки от невакцинированных цыплят | 0/125                                                              | 0/125                                | 0/125                |
| отрицательный контроль                | -                                                                  | -                                    | -                    |
| положительный контроль                | +                                                                  | +                                    | +                    |

Примечание: «-» – отрицательный результат реакции; «+» – положительный результат реакции

**Таблица 7 - Сравнение чувствительности и специфичности РТГА-Н9 в сыворотках крови кур с использованием антигенов различных производителей**

| Метод                    | чувствительность | специфичность | точность |
|--------------------------|------------------|---------------|----------|
| РТГА Н9 (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)  | 98%              | 100%          | 98%      |
| РТГА Н9 (GD, Нидерланды) | 97%              | 100%          | 99%      |
| ИФА (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)      | 99%              | 100%          | 99%      |

Воспроизводимость результатов оценивали по коэффициенту вариации в пределах одной постановки и между постановками, повторно исследуя 6 образцов сыворотки крови с различной концентрацией антител. Коэффициент вариации в пределах одной постановки (один день, один оператор) оценивали по 3 определениям (на 3-х планшетах), коэффициент вариации между постановками - по 3 определениям, выполненным в течение 2 разных дней двумя операторами (12 планшетов) (таблица 8).

**Таблица 8 – Оценка воспроизводимости набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в РТГА**

| Уровень антител к вирусу гриппа птиц Н9 в сыворотке крови | n=3 (3 планшета)                       |            | n=3x4 (12 планшетов)                   |            |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------|----------------------------------------|------------|
|                                                           | Средний титр антител, log <sub>2</sub> | Средний КВ | Средний титр антител, log <sub>2</sub> | Средний КВ |
| Низкий                                                    | 4,0±0                                  | 0          | 3,9±0,08                               | 7,37       |
| Низкий                                                    | 5,0±0                                  | 0          | 4,75±0,13                              | 9,52       |
| Средний                                                   | 6,0±0                                  | 0          | 5,83±0,11                              | 6,67       |
| Средний                                                   | 7,0±0                                  | 0          | 6,75±0,13                              | 6,70       |
| Высокий                                                   | 7,67±0,33                              | 7,5        | 7,75±0,13                              | 5,84       |
| Высокий                                                   | 8,67±0,33                              | 6,7        | 8,75±0,13                              | 5,17       |

Вариабельность в пределах одного анализа (три повторности на 3-х планшетах) была менее 8 %. Вариабельность между сериями анализа, определенная по измерениям

в трёх повторностях в четырех разных сериях анализов (на 12 планшетах), была не более 10 %.

В результате проведенной оценки разработанный набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в РТГА показал 100% специфичность и 98% чувствительность, воспроизводимость (коэффициент вариации не выше 10 % между разными сериями анализа) и правильность.

**Выявление антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови от разных видов птиц.** При исследовании 216 проб сывороток крови от диких и синантропных птиц, поступивших из трех ФО РФ, антитела к вирусу ГП подтипа Н9 были обнаружены в 26 пробах сывороток крови от диких уток и гусей (таблица 9).

**Таблица 9 - Выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в РТГА в сыворотках крови диких и синантропных птиц**

| Федеральный округ | Вид птицы          | Количество положительных результатов/общее количество проб |                                      |
|-------------------|--------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
|                   |                    | РТГА с антигеном Н9 (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)                        | РТГА с антигеном Н9 (GD, Нидерланды) |
| Сибирский         | Дикая утка         | 0/2                                                        | 0/2                                  |
| Центральный       | Дикий гусь         | 0/11                                                       | 0/11                                 |
|                   | Селезень           | 0/16                                                       | 0/16                                 |
|                   | Вальдшнеп          | 0/4                                                        | 0/4                                  |
|                   | Глухарь            | 0/4                                                        | 0/4                                  |
|                   | Тетерев            | 0/2                                                        | 0/2                                  |
|                   | Синантропная птица | 0/12                                                       | 0/12                                 |
| Северо-Западный   | Кряква             | 1/21                                                       | 1/21                                 |
|                   | Дикая утка         | 11/50                                                      | 13/50                                |
|                   | Гусь белолобый     | 6/49                                                       | 8/49                                 |
|                   | Селезень кряквы    | 4/17                                                       | 4/17                                 |
|                   | Чайка              | 0/9                                                        | 0/9                                  |
|                   | Связь              | 0/1                                                        | 0/1                                  |
|                   | Вальдшнеп          | 0/1                                                        | 0/1                                  |
|                   | Дикий гусь         | 0/9                                                        | 0/9                                  |
|                   | Чернеть хохлатая   | 0/2                                                        | 0/2                                  |
|                   | Голубь             | 0/6                                                        | 0/6                                  |
| Всего:            |                    | 22/216                                                     | 26/216                               |

Разработанный диагностический набор был апробирован на экспериментальных и полевых сыворотках крови птиц разных видов, запатентован, выпущен в производственных сериях и используется при проведении лабораторных исследований. В 2019-2025 гг. с помощью разработанного набора было исследовано 21219 проб сыворотки крови от вакцинированных и не вакцинированных домашних

птиц (кур и индеек) из 24 регионов Российской Федерации, поступивших в Референтную лабораторию вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ». Специфические антитела к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 были выявлены в 5437 пробах исследуемых сывороток.

### **3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

#### **3.1 Выводы**

1. С помощью ОТ-ПЦР-РВ из 58544 исследуемых проб биологического материала от домашних и диких птиц из 69 регионов Российской Федерации в период с 2018 по 2025 год было выявлено 1570 вирусов гриппа типа А. Подтип Н9Н2 в ОТ-ПЦР-РВ обнаружен в 77 пробах, из них 15 идентифицированы как вирус гриппа птиц подтипа Н9Н2.

2. В результате анализа нуклеотидных последовательностей гена гемагглютиниона вирусов Н9Н2 было установлено, что вирусы, выделенные на территории Дальневосточного ФО РФ в 2018-2025 гг. относились к генетической линии Y280 и имели генетическое сходство с вирусами Н9Н2, выделенными в странах Юго-Восточной Азии в 2018-2023 гг. Вирусы, выделенные в 2019-2025 гг. в Уральском, Приволжском, Сибирском и Южном ФО РФ принадлежали к генетической линии G1, распространенной в странах Ближнего Востока в 2007-2010 гг.. Представители азиатской группы Y439 были выявлены в биоматериале от диких уток Центрального и Дальневосточного ФО РФ.

3. Установлено, что у вирусов генетических линий Y-280 (A/chicken/Tadjikistan/2379/2018, A/chicken/Primorsk/419/2018) и G1 (A/chicken/Zabaikal/2137/2019, A/chicken/Chelyabinsk/314-1/2020) аминокислотная последовательность сайта нарезания гемагглютиниона имела сходную структуру, содержащую 6 основных аминокислот RSS(R/G)LF. Индексы патогенности испытуемых изолятов имели значения от 0,02 до 0,14, что охарактеризовало их как низковирулентные. У экспериментально зараженных цыплят отмечали выраженный гуморальный иммунный ответ, однако при изучении клеточного иммунитета было показано наличие изменений, характерных для иммунной супрессии.

4. На основе штамма A/chicken/Primorsk/419/2018 получены иммуноспецифические компоненты для диагностической тест-системы (антиген и гипериммунные сыворотки) в реакции торможения гемагглютинации, которые после оптимизации условий технологии получения, вошли в состав «Набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в РТГА».

5. Показано применение разработанного набора для исследования сывороток крови разных видов сельскохозяйственных и диких птиц. Специфичность

разработанного набора относительно антигенов разных производителей составила 100%, чувствительность - 98%. Набор был успешно апробирован с использованием экспериментальных и полевых сывороток крови кур от вакцинированного и невакцинированного поголовья, диких и синантропных птиц.

### 3.2 Практические предложения

1. Определение полных нуклеотидных последовательностей генома изолятов A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2, A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 H9N2, A/chicken/Zabaikal/2137/2019 H9N2, A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2, A/chicken/Samara/429-75/21, A/chicken/Sverdlovsk/1436/21 и A/chicken/Amur/1666/23 позволяет предположить происхождение и проследить генетическую изменчивость вируса гриппа в сравнении с другими изолятами.

2. Проведено депонирование использованных в работе диагностических штаммов A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2, A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 H9N2, A/chicken/Zabaikal/2137/2019 H9N2 в ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ». Штамм A/chicken/Chelyabinsk/314-1/2020 генетической группы G1 запатентован и может быть применен для разработки диагностической тест-системы с целью контроля постинфекционного и поствакцинального иммунитета. Получен патент на штамм A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2 для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики низкопатогенного гриппа птиц.

3. По результатам проведенных исследований разработан и утвержден комплект НТД (инструкция, стандарт и промышленный регламент) на производство «Набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в реакции торможения гемагглютинации». Набор запатентован.

### 3.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Основным направлением дальнейших исследований является выделение и изучение биологических свойств циркулирующих вирусов низкопатогенного гриппа птиц на территории РФ с целью актуализации информации о эволюции патогена и совершенствования препаратов диагностики и специфической профилактики.

## 4 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ

### ДИССЕРТАЦИИ

1. Серологический мониторинг гриппа птиц в Российской Федерации в 2017-2018 годах / М.А. Волкова, Ир.А. Чвала, П.С. Ярославцева, В.Ю. Сосипаторова, **О.С. Осипова** // Ветеринария сегодня. - 2019. - № 2 (29). - С. 3-11.

2. Анализ генетических свойств изолята вируса гриппа A/Chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2, выделенных на территории Челябинской области / Зиняков Н.Г., **Осипова О.С.**, Акшалова П.Б., Сосипаторова В.Ю., Андриясов А.В., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. // Ветеринария сегодня. - 2019. - № 4 (31). - С. 49-53

3. Серологический мониторинг гриппа птиц и ньюкаслской болезни в Российской Федерации в 2019 году / М.А. Волкова, Ир.А. Чвала, **О.С. Осипова**, М.А. Кулагина, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала // Ветеринария сегодня. - 2020. – № 2 (33). – С. 76-82.

4. Изучение иммунного ответа цыплят после экспериментального заражения изолятами вируса гриппа птиц А/Н9N2 / **Осипова О.С.**, Волкова М.А., Фролов С.В., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. // Ветеринария сегодня. - 2022. - Т. 11, № 1. - С.70-76.

5. Серологический мониторинг гриппа птиц и ньюкаслской болезни на территории Российской Федерации в 2020 г. / М.А. Кулагина, М.А. Волкова, Ир.А. Чвала, **О.С. Осипова**, П.С. Ярославцева, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала. // Ветеринария сегодня. - 2022. - Т. 11, № 2. - С. 142-148.

6. Genetic analysis of genotype G57 H9N2 avian influenza virus isolate A/chicken/Tajikistan/2379/2018 recovered in Central Asia / N.G. Zinyakov, V.Yu. Sosipatorova, A.V. Andriyasov E.V. Ovchinnikova, Z.B. Nikonova, A.A. Kozlov, D.A. Altunin, **O.S. Osipova**, P.B. Akshalova, D.B. Andreychuk, I.A. Chvala // Archives of Virology. - 2021.

7. Использование полногеномного секвенирования в процессе изучения вновь выделяемых вирусов гриппа птиц / Н.Г. Зиняков, **О.С. Осипова**, А.В. Андриясов, В.Ю. Сосипаторова, Д.А. Алтунин, Ил.А. Чвала. – Ставрополь: Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы III Всерос. научно-практ. конф. с междунар. участием, 2019. - С. 158-159.

8. Характеристика изолятов вируса гриппа А/Н9N2 в качестве антигенов для производства РТГА наборов / **О.С. Осипова**, Ир.А. Чвала, В.Ю. Сосипаторова, А.В. Андриясов, Н.Г. Зиняков, М.А. Волкова, П.С. Ярославцева, Ил.А. Чвала. – Ставрополь: Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы III Всерос. научно-практ. конф. с междунар. участием, 2019.– С. 281-282.

9. Выбор олигонуклеотидных праймеров и оптимизация постановки ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипа N8 / Акшалова П.Б., **Осипова О.С.**, Андриясов А.В., Щербакова Л.О., Колосов С.Н., Чвала И.А., Андрейчук Д.Б. // Достижения молодых ученых - в вет. практику: материалы 5-й Междунар. науч. конф. - Владимир, 2019. - С. 77-83.

10. Эпизоотическая ситуация по гриппу птиц на территории РФ в 2017-2018 годах / П.С. Ярославцева, Ир.А. Чвала, М.А. Волкова, **О.С. Осипова**, В.Ю. Сосипаторова, Ил.А. Чвала. – Ставрополь: Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы III Всерос. научно-практ. конф. с междунар. участием, 2019. - С. 88-89.

11. Выделение и изучение изолятов вируса гриппа птиц подтипа Н9N2 на территории РФ 2018-2020 гг. / **Осипова О.С.**, Сосипаторова В.Ю., Зиняков Н.Г., Акшалова П.Б., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. // Сборник научных трудов КазНИВИ – 2020, г. Алматы, с. 76-82

12. Применение набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в реакции торможения гемагглютинации для мониторинга низкопатогенного гриппа птиц / **О.С. Осипова**, М.А.Волкова, Ир.А.Чвала, П.Б.Акшалова, Д.Б.Андрейчук, И.А.Чвала // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. Матер. междунар. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию со дня рождения И.В. Звягина (октябрь, 2020), Щелково.- ВНИТИБП. – 2020. – С. 66-70.

13. Мониторинг низкопатогенного штамма гриппа птиц подтипа Н9 / **О.С. Осипова**, М.А. Волкова, Д.Б. Андрейчук, Ил.А. Чвала // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Армавирской биофабрики. - 2021. - С. 69-73.

14. Серологический мониторинг низкопатогенного гриппа птиц подтипа Н9 в РФ/ **О.С. Осипова**, М.А. Волкова, П.С. Ярославцева М.А. Кулагина, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала. // Материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Института экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского, Современные достижения в решении актуальных проблем агропромышленного комплекса, г. Минск, 15-16 сентября 2022 г. - С. 46-49.

15. Случай выявления вируса гриппа птиц подтипа H9N2 в 2023 году/ **Осипова О.С.**, Овчинникова Е.В., Жестков П.Д., Андриясов А.В., Зиняков Н.Г., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.// Сборник трудов XI Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика», РФ, г. Москва, 2023г, с. 325-326.
16. Результаты серомониторинга гриппа птиц в 2022-2023 гг. в Российской Федерации / **Осипова О.С.**, Жестков П.Д., Волкова М.А., Чвала Ир.А., Ярославцева П.С., Кулагина М.А., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Инновационные решения актуальных вопросов биологической и токсикологической безопасности", РТ, г. Казань, 2023 г. С. 166-169.
17. Avian influenza subtype H9 viruses, identified in the Russian Federation and the Republic of Tajikistan in 2018: научное издание / Zinyakov N.G., **Osipova O.S.**, Andriyasov A.V., Sosipatorova V.Yu., Altunin D.A., Andreichuk D.B., Chvala I.A. // XXIst World Veterinary Poultry Association Congress (WVPAC 2019), Bangkok, Thailand. - Bangkok, Thailand, 2019. - Ст. PA-15. - P233.
18. Characterization of AIV H9 field viruses isolated in Russia during 2012-2018 for using in hemagglutination inhibition test kit / Chvala I.A., **Osipova O.S.**, Volkova M.A., Mudrak N.S., Chvala I.A., Andreichuk D.B. // XXIst World Veterinary Poultry Association Congress (WVPAC 2019), Bangkok, Thailand. - Bangkok, Thailand, 2019. - Ст. PA-16. - P233-234.
19. Detection of avian influenza virus antibody among domestic avian species in Russia in 2018 / Yaroslavtseva P.S., Volkova M.A., Chvala I.A., **Osipova O.S.**, Kulagina M.A., Chvala I.A., Andreichuk D.B.// XXIst World Veterinary Poultry Association Congress (WVPAC 2019), Bangkok, Thailand. - Bangkok, Thailand, 2019. - Ст. PA-17. - P234.
20. Случай выявления возбудителя низкопатогенного гриппа птиц подтипа H9N2 в 2024 г.: сборник научных трудов / **О.С. Осипова**, А.В. Андриясов, Е.В. Овчинникова, П.Д. Жестков, А.Д. Грехнева, Н.Г. Зиняков, А.А. Щербина, Д.Б. Андрейчук, Ил.А. Чвала // Вирусные инфекции - от диагностики к клинике. Сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 80-летию со дня рождения академика РАН О.И. Киселева. - 2025. - С. 60-61.
21. Результаты мониторинга гриппа птиц на территории Российской Федерации в 2023 г.: сборник научных трудов / М.А. Кулагина, М.А. Волкова, Ир.А. Чвала, **О.С. Осипова**, П.С. Ярославцева, Д.Б. Андрейчук, Ил.А. Чвала // Вирусные инфекции - от диагностики к клинике. Сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 80-летию со дня рождения академика РАН О.И. Киселева. - 2025. - С. 43-44
22. Выявление антител к вирусу гриппа птиц в сыворотках крови различных животных в РТГА с использованием наборов производства ФБГУ «ВНИИЗЖ» / Ир.А. Чвала, М.А. Кулагина, М.А. Волкова, П.С. Ярославцева, **О.С. Осипова**, Т.С. Галкина, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала // Материалы международной научно-практической конференции «Инновационные и современные методы диагностики, профилактики и лечения инфекционных болезней в промышленном птицеводстве и животноводстве». ИВМ ТАСХН, Душанбе, 2025.
23. Серологический мониторинг гриппа птиц на территории Российской Федерации в 2023-2024 г.г. / Кулагина М.А., Волкова М.А., Чвала Ир.А., **Осипова О.С.**, Ярославцева П.С., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. // Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК. Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Казань, 2025. С.106-110.
24. Серологический мониторинг Ньюкаслской болезни и гриппа птиц в Российской Федерации в 2024 году с применением отечественных наборов / Чвала И.А., Волкова М.А., Ярославцева П.С., **Осипова О.С.**, Кулагина М.А., Сосипаторова В.Ю., Андрейчук Д.Б. // «Биологическая безопасность в условиях глобальных угроз: научно-технологические подходы противодействия». Материалы международной научно-практической конференции. Астана, 2025. С.48.

