

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

На правах рукописи

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»

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель –
Чвала Илья Александрович
кандидат ветеринарных наук

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
2.1. Низкопатогенный грипп птиц: общая характеристика болезни.....	11
2.2. История распространения низкопатогенного гриппа птиц, вызванного вирусом подтипа H9.....	12
2.3. Таксономия вирусов гриппа птиц.....	19
2.4. Строение вируса гриппа птиц типа A.....	20
2.5. Устойчивость вируса гриппа птиц во внешней среде и к физико-химическим факторам.....	22
2.6. Эпизоотология.....	24
2.7. Патогенез болезни, клинические признаки, патологоанатомические изменения при низкопатогенном гриппе птиц	26
2.8. Лабораторная диагностика гриппа птиц.....	29
2.8.1. Молекулярно-генетические методы.....	31
2.8.2. Серологическая диагностика.....	34
2.9. Заключение по обзору литературы.....	35
3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
3.1. Материалы.....	37
3.2. Методы исследований.....	40
3.3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	45
3.3.1. Обнаружение и выделение вирусов гриппа птиц подтипа H9.....	45
3.3.1.1. Выявление и идентификация вируса гриппа птиц подтипа H9 в образцах биоматериала птиц.....	45
3.3.1.2. Выделение изолятов H9N2.....	47
3.3.2. Молекулярно-генетические свойства изолятов.....	48
3.3.2.1. Филогенетический анализ по гену гемагглютиниона вирусов гриппа птиц подтипа H9.....	48

3.3.2.2. Сравнительный анализ генома вирусов H9N2 генетической группы Y280.....	53
3.3.2.3. Генетический анализ изолятов H9N2 генетической группы G1.....	55
3.3.2.4. Анализ маркеров адаптации к репликации в организме млекопитающих и маркеров патогенности вируса гриппа птиц подтипа H9.....	69
3.3.2.5. Возможность использования результатов полногеномного секвенирования для определения генезиса выявляемых вирусов.....	70
3.3.3. Определение вирулентных свойств вирусов H9N2.....	74
3.3.4. Изучение гуморальных и клеточных факторов иммунного ответа при инфицировании цыплят.....	75
3.3.4.1. Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов.....	76
3.3.4.2. Серологические исследования.....	81
3.3.5. Определение антигенной активности изолятов H9N2.....	82
3.3.6. Получение специфических компонентов для использования в наборе для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 в реакции торможения гемагглютинации.....	84
3.3.6.1. Получение антигена вируса гриппа птиц подтипа H9.....	85
3.3.6.2. Получение положительной и нормальной контрольных сывороток крови.....	85
3.3.7. Определение основных валидационных характеристик разработанного набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 в реакции торможения гемагглютинации.....	86
3.3.8. Оценка стабильности иммуноспецифических компонентов набора при хранении.....	91
3.3.9. Применение разработанного набора для оценки уровня антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 в популяциях сельскохозяйственных, синантропных и диких птиц.....	93
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	97
4.1. Выводы.....	97
4.2. Практические предложения.....	98

4.3. Перспективы дальнейшей разработки темы.....	99
5. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	100
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101
7. ПРИЛОЖЕНИЯ.....	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Грипп птиц (ГП) – контагиозная вирусная болезнь птиц, характеризующаяся поражением органов дыхания и пищеварения, протекающая от бессимптомной инфекции до тяжелой генерализованной септицемии [1]. 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 [109, 129].

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 [52, 105, 144]. Циркуляция вирусов гриппа птиц подтипа H9 с другими подтипами может способствовать формированию новых реассортантных вирусов, способных преодолевать межвидовой барьер [51, 81]. Среди вирусов гриппа птиц подтипа H9 наиболее распространен подтип H9N2. В настоящее время вирусы H9N2 широко распространены в Африке и Юго-Восточной Азии [46, 95, 103]. В качестве профилактических мероприятий и борьбы с болезнью многие страны внедрили программы вакцинации (Китай, Израиль, Южная Корея, Марокко, Пакистан, Египет, Иран, ОАЭ) [42]. Применение инаktivированных вакцин доказало свою эффективность в снижении тяжести болезни, но не остановило распространение инфекции [31, 58, 66, 75, 133]. 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 [5].

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 [15, 22, 55]. 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 [21, 27, 40, 49, 67, 89, 108, 137, 141]. Появление вируса гриппа птиц подтипа H9 в Китае способствовало их большому филогенетическому разнообразию. Особый интерес ученых связан с выявлением вирусов, обладающих пандемическим потенциалом [46, 54, 63, 64, 81, 136]. 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 [2, 4, 5, 6, 11].

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.

Цели 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 Н9 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 Н9 в пробах сывороток крови разных видов птиц.

Научная новизна.

Изучены биологические свойства изолятов Н9N2, выделенных в период с 2018 по 2025 год.

Установлена филогенетическая принадлежность вирусов Н9N2, выделенных на территории Российской Федерации, к разным генетическим линиям.

Впервые определены полногеномные последовательности выбранных изолятов Н9N2, 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 Н9N2.

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 иммуннотипические компоненты (антигены и гипериммунные сыворотки), на основе которых был разработан «Набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 в реакции торможения гемагглютинации». Оформлен комплект нормативно-технической документации, содержащий инструкцию и СТО 00495527-0334-2019 (приложение 1).

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» (приложения 2, 3, 4, 5).

Получены патенты 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 (приложение 6, 7).

Получен патент Российской Федерации (в соавторстве) № RU 2738900 C1 от 18.12.2020 на «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 (приложение 8).

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 на основе утвержденных методик. Работа была проведена 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 и ФГБУ «ВНИИЗЖ» в период с 2018 по 2025 год, доложены в работе: III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2019 г.), XXI Всемирной ветеринарной ассоциации птицеводства World Veterinary Poultry Association Congress (Бангкок, 2019 г.), 5-ой Международной научной конференции «Достижения молодых ученых - в ветеринарную практику» (Владимир, 2019 г.), Международной научно-практической конференции «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» (Щелково, 2020 г.), Международной научно-практической конференции «Современные достижения в решении актуальных проблем агропромышленного комплекса» (Минск, 2022 г.), XI Международной научно-

практической конференции «Молекулярная диагностика» (Москва, 2023 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновационные решения актуальных вопросов биологической и токсикологической безопасности», (Казань, 2023 г.). Международной научно-практической конференции «Инновационные и современные методы диагностики, профилактики и лечения инфекционных болезней в промышленном птицеводстве и животноводстве» (Душанбе, 2025 г.), Международной научно-практической конференции (Астана, 2025 г.), Международной научно-практической конференции, посвящённой 65-летию ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Казань, 2025 г.), Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 80-летию со дня рождения академика РАН О. И. Киселева (Санкт-Петербург, 2025 г.).

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., за активное содействие 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. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Низкопатогенный грипп птиц: общая характеристика болезни

Возбудителем низкопатогенного гриппа птиц является РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Orthomyxoviridae [97]. На сегодняшний день грипп птиц вызывается только вирусом гриппа А, который подразделяется на подтипы на основе антигенных различий двух поверхностных гликопротеинов: гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА). Известно 18 гемагглютинирующих (Н1–Н18) и 11 нейраминидазных подтипов (N1–N11) вирусов гриппа А. Среди них подтипы Н1–Н16 и N1–N9 были выделены от диких водоплавающих птиц, в то время как вирусы подтипов Н17N10 и Н18N11 были выделены от летучих мышей в Гватемале (Центральная Америка) и в Перу (Южная Америка) [108, 129]. Согласно литературным данным, от птиц вирус гриппа указанных подтипов не выделяли. В Казахстане в биоматериале от дикой утки (*Aythya ferina*) был выявлен подтип гемагглютинаина вируса гриппа А Н19 (А/common pochard/Kazakhstan/Kz52/2008), который по структурной характеристике гемагглютинаина тесно связан с вирусом, выделенным от летучих мышей [74].

Контроль над низкопатогенным гриппом птиц затруднен из-за бессимптомного течения заболевания. В настоящее время в полугодовых отчетах Всемирной организации здоровья животных (ВОЗЖ) допускаются уведомления о низкопатогенных вирусах подтипов Н5 и Н7, если нет выраженной клинической картины заболевания, снижения продуктивности, расширения круга хозяев и признаков зооноза. Согласно Кодексу здоровья наземных животных, выявление данной инфекции не влияет на статус страны или зоны [113]. Низкопатогенный грипп птиц, обусловленный штаммом с повышенной вирулентностью с доказанной способностью передачи от диких и домашних птиц к человеку, нотифицируется как эмерджентная инфекция [154].

В экспериментальных условиях, при внутривенном заражении цыплят, вирусы низкопатогенного гриппа птиц не вызывают выраженной клинической

картины болезни, однако в условиях птицеводческих хозяйств при ассоциированном течении с другими коинфекциями, включая микоплазму, вирус инфекционного бронхита кур, вирус инфекционной бурсальной болезни и вирус ларинготрахеита птиц, способны вызывать синергетический эффект, приводящий к высокому падежу. Клинически выраженное заболевание при заражении низкопатогенным гриппом птиц проявляется у сельскохозяйственных птиц снижением яичной продуктивности у несушек, повышением отхода у бройлеров, признаками поражения респираторной и пищеварительной систем [20, 105, 144].

Среди вирусов низкопатогенного гриппа птиц (НГП) наиболее распространен подтип Н9, который обладает пандемическим потенциалом, поскольку за счет реассортации претерпевает быструю эволюцию и может передаваться от птицы к человеку [32, 39, 99, 114]. Начиная с 1990-х годов сообщалось о спорадических случаях заражения людей вирусом Н9N2. По литературным данным до 2025 года всего зарегистрировано 168 случаев заболеваний человека [61, 136]. Вирус с гемагглютинином данного подтипа неоднократно был выделен от свиней, собак, лошадей, норок, хорьков и мышей [25, 125]. В 2017 году в Египте вирус подтипа Н9N2 впервые был выделен от нильского крылана (*Rousettus aegyptiacus*), что свидетельствует о зоонозном потенциале репликации адаптированного к млекопитающим вируса Н9N2 [36].

Вследствие того, что вирусы низкопатогенного гриппа птиц способны преодолевать межвидовой барьер, необходим постоянный контроль с целью выявления неблагополучных территорий. Одной из важных мер по уменьшению распространения вирусов низкопатогенного гриппа птиц является сокращение межрегиональной торговли живой птицей, усиление мониторинга, а также своевременная разработка программ профилактических мероприятий.

2.2 История распространения низкопатогенного гриппа птиц, вызванного вирусом подтипа Н9

Впервые вирус подтипа Н9 был выделен в феврале 1966 года от индеек в северном Висконсине в США. Эти вирусы остаются энзоотическими у домашней

птицы и широко распространены в значительной части Азии, на Ближнем Востоке и в некоторых частях Африки [21]. Представленные в таблице 1 данные показывают разнообразие вирусов гриппа птиц подтипа H9, выделенных в разных странах мира.

Таблица 1 - Распространение вируса гриппа птиц подтипа H9 в мире [21, 46, 65, 72, 95, 101]

№	Период, (год)	Страна	Подтип	Восприимчивое поголовье
1	1970	Шотландия	H9N7	индейки
2	1995, 1997, 1998, 2004	Германия	H9N2	индейки, домашние утки, цыплята
3	1994, 1997–2002, 2003-2004, 2020-2021	Пакистан	H9N2	цыплята бройлеры, куры
4	1996, 1999, 2004–2008	Ю. Корея	H9N2	куры
5	с середины 90-х по настоящее время	Китай	H9N2	домашняя птица
6	1998–2001	Иран	H9N2	цыплята бройлеры
7	с 2000	Израиль	H9N2	домашняя птица
8	2006–2012			
9	2003–2004	Индия, Гонконг Корея	H9N2 H9N8	куры
10	2001–2003	ОАЭ	H9N2	перепела, цыплята
11	2003	Франция	H9N7	индейки
12	2005	Ливия, Ливан	H9N2	цыплята- бройлеры, куры
13	1994, 1996 2004	Италия	H9N2 H9N8	цыплята домашние гуси
14	1995, 2006	ЮАР	H9N2	страусы
15	2009–2010	Тунис	H9N2	цыплята
16	2010	Великобритания, Вьетнам	H9N1 H9N6	куры домашние утки
17	2011-2023	Бангладеш	H9N2	цыплята, индейки
18	2011	Египет	H9N2	перепела
19	2013-2014	Великобритания, Польша	H9N2	индейки
20	2015-2016	Египет	H9N2	цыплята-бройлеры, куры
21	2017-2022	Республика Гана	H9N2	куры
23	2018-2019	Марокко	H9N2	цыплята-бройлеры
24	2022-2023	Корея, Египет, Марокко	H9N2	куры, цыплята-бройлеры
25	2024-2025	Китай, Сенегал	H9N2	утки, куры

Значительную часть среди изученных вирусов занимает вирус с антигенной формулой H9N2. Интересно, что штаммы подтипа H9 были связаны с каждым из

известных девяти описанных подтипов нейраминидазы (NA), но более 75% из уникальных общедоступных последовательностей гемагглютинирина (HA) сопряжены с последовательностями подтипа N2, что предполагает предпочтительную ассоциацию и коэволюцию этих двух сегментов генов в природе [21].

В Азии вирус H9N2 до 80-х гг. обнаруживали только среди диких водоплавающих птиц, но по мере распространения его начали выявлять и среди домашних птиц, таких как перепела, фазаны, куропатки [132]. Первые свидетельства наличия вирусов гриппа птиц подтипа H9 у домашней птицы в Азии были получены в 1988 году, когда вирус H9N2 был выделен от мертвых перепелов во время вспышки респираторного заболевания на одной из ферм в Гонконге. Филогенетический анализ азиатских вирусов H9N2 предполагает, что они многократно передавались от водоплавающих к домашним птицам, однако естественный резервуар в Азии не был идентифицирован [130].

В материковой части Китая в провинции Гуандун с ноября 1992 года по май 1994 года вирус гриппа птиц подтипа H9 впервые был выделен от кур [104]. К концу 1990-х годов вирусы H9N2 были обнаружены в большинстве провинций Китая, что было связано с деятельностью рынка живой птицы в течение всего года, причем заболеваемость колебалась от 0,2% до почти 5% в зависимости от рынка и времени года [73, 78]. Меры контроля, которые включали запрет на продажу мелкой домашней птицы, привели к снижению циркуляции, но не к искоренению вируса H9N2 на рынках живой птицы в Гонконге [30, 42].

Широкое распространение данного вируса по всему миру началось в конце 20 века [27, 155]. Во многих странах регистрировали вспышки ассоциированных форм болезни. В КНР и странах Ближнего Востока вирус гриппа птиц подтипа H9 стал эндемичным. Вирусы, родственные китайским изолятам, получили распространение у домашней птицы в странах Азии, Среднего Востока, Северной и Западной Африки [21].

Согласно эпидемиологическим и генетическим исследованиям, вирусы H9N2 дифференцируют на американскую и европейскую линии [29]. Вирусы

американской линии (североамериканские и южноамериканские) найдены главным образом у дикой птицы, но описаны случаи инфицирования домашних индеек. Евразийские вирусы H9N2 разделяют на сублинии, названные по их вирусам-прототипам:

- G1-h9.4 (A/Quail/Hong Kong/G1/97);
- BJ94-h9.3 (A/Chicken/Beijing/1/94) или Y280-like (A/Duck/Hong Kong/Y280/97) или G9-like (A/chicken/Hong Kong/G9/97);
- Y439-h9.2 (A/Duck/Hong Kong/Y439/97);
- Korea like- h9.2.2 (A/chicken/Korea/38349-p96323/96) [21, 42] (см. рисунок 1).

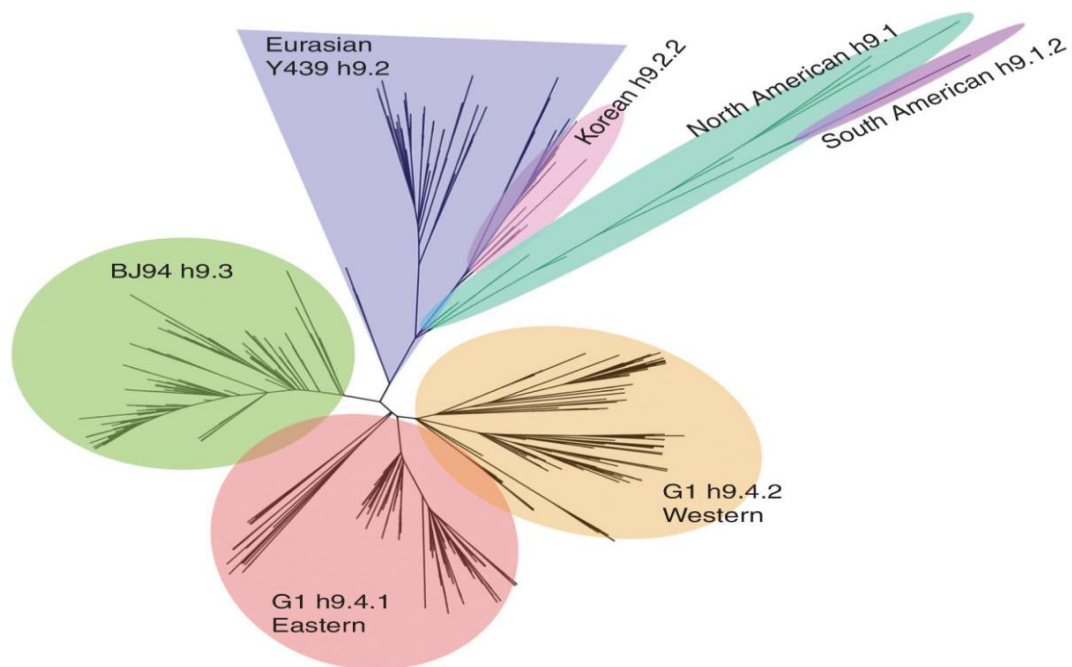


Рисунок 1. Филогенетическое дерево вирусов гриппа птиц подтипа Н9 на основе нуклеотидной последовательности НА [42]

Примечание: h9.1-североамериканская и h9.1.2-южноамериканская; h9.2-евразийская Y439; h9.2.2-корейская; h9.3-BJ94 (Y280); h9.4.1-G1- восточная; h9.4.2-G1 -западная генетические линии вирусов H9N2.

Линия G1 разделена филогенетически и географически на «западную» и «восточную» сублинии.

В Южной Азии вирус H9N2 выявляли в Бангладеш и Пакистане, а также в Индии, Афганистане и Непале [23, 126]. Большинство вирусов, выявленных у домашней птицы в Южной Азии, относились к "западной" сублинии G1-like, но случаи выявления вирусов линии Y439 спорадически отмечали среди дикой и

домашней птицы. Преобладающая «западная» сублиния G1-like, по-видимому, возникла в результате реассортации между коциркулирующими вирусами H7N3 и H9N2, которые заменили собой другие местные клады [69, 112].

Вирус H9N2 изолирован во многих странах Ближнего Востока, включая Египет, Иран, Израиль, Саудовскую Аравию и Объединённые Арабские Эмираты [26, 44, 82, 83, 84, 108]. Вирус H9N2 выделяли в Ираке, Иордании, Кувейте, Ливане и Омане [38, 47, 71, 77, 135]. В Израиле массовая вакцинация домашней птицы в 2003 году принесла определенные успехи в ограничении распространения вируса, однако, в период с 2006 по 2012 год выявляли новые штаммы вируса. Как и в Южной Азии, большинство вирусов H9N2, обнаруженных на Ближнем Востоке, относились к "западной" сублинии G1-like [76].

С 2010 г. вирус H9N2 выявляли у кур в Египте, Ливии и Тунисе [27, 45, 80, 82, 90]. С 2016 года вирус H9N2 впервые был обнаружен в странах Северной и Западной Африки, включая Марокко, Гану и Алжир, а также в Восточной Африке, в Уганде. Впоследствии Марокко осуществил успешную массовую кампанию вакцинации домашней птицы [66]. Все вирусы, выделенные от домашней птицы в Африке, относились к "западной" сублинии G1-like, связанной с вирусами, циркулирующими на Ближнем Востоке в Израиле, Иордании, Ливане, Саудовской Аравии и Объединенных Арабских Эмиратах.

В 1995 году в Южной Африке вирус H9N2 впервые был изолирован от страусов, которые, вероятно, явились «тупиковой» ветвью распространения вируса, так как не было обнаружено доказательств его дальнейшей циркуляции [90, 121]. Согласно исследованиям Oluwayelu D.O специфические антитела к вирусу H9N2 были выявлены у нигерийской домашней птицы, что подтвердило занос вируса в Нигерию [67].

Вирусы H9N2 периодически изолировали от домашней птицы в США в течение второй половины XX века. В этот период был выделен один из первых изолятов A/turkey/Wisconsin/1/1966. Все изолированные вирусы принадлежали к американской линии. В 2005 году в Колумбии были выявлены антитела к вирусу H9N2, однако вирус не был идентифицирован [132]. В 2007 году Аргентине от

дикой водоплавающей птицы был выделен вирус H9N2, генетически схожий с вирусом из Северной Америки [90].

В середине 1990-х годов вирусы H9N2 линии Y439 первоначально выявляли во время вспышек у кур в Южной Корее и у домашних уток в Гонконге. В Южной Корее циркулировали вирусы, принадлежащие к обособленной линии Korean-like, впервые выявленные в 1996 г. и вызвавшие увеличение падежа птиц до 30% [98, 127].

Вирусы, подобные Y439-h9.2, спорадически выделяли у диких птиц и эпизодически у домашних птиц по всей Евразии. Вирусы линии BJ94-like и G1-like «восточной» сублинии были связаны со вспышками среди домашних птиц в Китае, Вьетнаме, Камбодже, Мьянме и Индонезии [21, 121].

В Европе вирус H9N2 спорадически обнаруживали у диких и домашних птиц. Вирус H9N2 был выявлен в Финляндии в 2009 году у диких водоплавающих птиц [106]. В Германии, Италии, Англии, Нидерландах и Польше были зарегистрированы случаи обнаружения вируса в стадах индеек в 2009-2014 гг [106, 111]. В Германии вспышки заболевания у индеек, вызванные корейской линией вируса H9N2, наблюдали с 2012 года. Вирус H9N2 линии Y439 выделяли от диких птиц в Великобритании, Нидерландах, Польше, Венгрии, Италии и Ирландии [58, 75, 150]. В Германии в связи с выявлением вируса H9N2 линии G1 применяли вакцинацию в некоторых регионах страны [27].

В апреле 2013 года вирус H9N2 был выявлен у индеек на одной из ферм в Восточной Англии. При заболевании индеек смертность молодняка составила 50%. При патологоанатомическом вскрытии был выявлен аэросаккулит. Несмотря на высокую летальность, большинство индеек не проявляли никаких клинических признаков болезни. Генетический анализ показал, что вирус H9N2 имел европейское происхождение [150].

Филогенетический анализ гена гемагглютинина вируса H9N2 показал, что в период с 2017 по 2021 год в Китае преобладали вирусы генетической линии G1 (h9.4.2.5). Были выявлены аминокислотные мутации I155T, N183N, V190T, N198T, Q226L, Q227M, которые повысили способность вируса к межвидовому

распространению [103]. У домашних уток воздействие генетической линии BJ94 вирусов, выделенных после 2021 года, приводило к активации врождённого иммунитета и выработке повышенного уровня воспалительных цитокинов (IL-2, IL-6 и IL-8) [60].

На территории Российской Федерации наблюдалось распространение низкопатогенного гриппа в птицеводческих хозяйствах Дальневосточного региона. В феврале 2012 года на птицефабрике Дальневосточного региона РФ был выявлен вирус H9N2 во время вспышки респираторной болезни с повышенным отходом. В течение 2012 года вирус H9N2 был обнаружен в биологическом материале диких птиц из Центральной части России, Сибири и Дальнего Востока. В литературных источниках информация по распространению низкопатогенного гриппа, вызванного вирусом подтипом H9, на территории РФ в 2013-2017 гг. незначительна. Проведение профилактических мероприятий, включающих иммунизацию поголовья, значительно снизило случаи возникновения заболевания. В связи с распространением вируса H9N2 в ФГБУ «ВНИИЗЖ» была разработана вакцина на основе штамма «A/chicken/Amursky/03/12/H9N2» [2, 16]. В 2017-2018 гг. были отмечены случаи обнаружения вируса H9N2 у уток в охотничьем хозяйстве Тульской области, у диких перелётных птиц в Томской области и в Хабаровском крае. Следует отметить, в 2018 году в Приморском крае Дальневосточного ФО обострилась проблема распространения низкопатогенного гриппа птиц, вызванного вирусом подтипа H9. На трех птицефабриках Дальнего Востока регистрировали снижение продуктивности и увеличение падежа в связи респираторным течением болезни [5, 12]. В связи с распространением вируса H9N2 научные институты стали разрабатывать вакцины на основе актуальных штаммов. В ФГБУ «ВНИИЗЖ» были разработаны вакцины против низкопатогенного гриппа птиц на основе штаммов двух генетических линий (Y280 и G1) [14, 17, 18]. С целью проведения серологического мониторинга и контроля поствакцинального и постинфекционного иммунитета возникла необходимость в разработке тест-системы для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 на основе соответствующего актуального штамма.

Таким образом, вирусы H9N2 имеют достаточно широкое распространение в мире, особенно в странах Азии и Ближнего Востока. Принимая во внимание факт об отсутствии обязательной нотификации заболевания можно сделать предположение о более широком ареале распространения инфекции.

2.3 Таксономия вирусов гриппа птиц

Согласно международной классификации International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) релиз ICTV 2024 Master Species List (MSL40) вирусы гриппа отнесены к семейству Orthomyxoviridae (по классификации ICTV - 00.046, по классификации The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ID: 11308), включающего 7 родов: Alphainfluenzavirus (A), Betainfluenzavirus (B), Deltainfluenzavirus (D), Gammainfluenzavirus (C), Isavirus, Quaranjavirus, Thogovirus. Вирус гриппа птиц принадлежит к роду Alphainfluenzavirus (ID: 197911), виду Influenza A virus (ID 00.046.0.01.001) [86, 87]. Таксономическое деление вирусов гриппа определяется консервативными элементами генома, задающими антигенные характеристики нуклеокапсидов. Вирусы, относящиеся к разным родам, не имеют общих антигенов. Генетической реассортации между вирусами разных родов не происходит [143, 152].

Полная номенклатура штаммов требует указания рода вируса гриппа, вида животного, от которого вирус был выделен, географического места выделения, порядкового номера, года выделения и антигенного описания подтипов HA и NA (например, A/goose/Guangdong/1/96 H5N1) [6, 79, 145].

Экспертами ВОЗ в 2024 году была предложена новая автоматическая онлайн система классификации и номенклатуры вирусов гриппа подтипа H9 (<https://nmhc.cn/influvar/tools/H9aiv>), которая учитывает филогенетические связи и эпидемиологические характеристики циркулирующих изолятов. Согласно данной классификации, были выделены три генетические линии Y (ранее Y439, или корейскую, h9.3 и американскую h9.1 и h9.2), G (ранее G1 или h9.4.1) и B (ранее известная как BJ/94, Y280, G9 или h9.4.2) [125].

2.4 Структура вируса гриппа А

Вирионы вируса гриппа А имеют наружную липопротеиновую оболочку, чаще сферической формы. Диаметр сферических форм 60-180 нм. Встречаются нитевидные формы вирионов, значительно превышающие сферические формы по длине (200-350 нм) [145]. В вирусных частицах содержится 70 % белка, 18-37 % липидов, 5-8% углеводов и 1% РНК. Углеводы и липиды имеют клеточное происхождение. Молекулярная масса одного вириона 250 МД, плавучая плотность в сахарозе 1,19 г/см³ [4].

Вирусная частица покрыта липидной бислойной мембраной, в которую погружены шипы мембранных белков (рисунок 2).

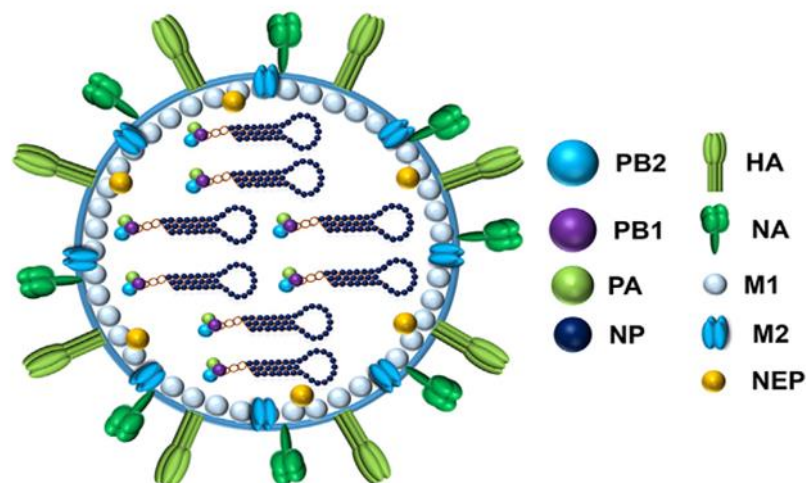


Рисунок 2 - Структура вириона вируса гриппа А [149]

Белок гемагглютинин (НА) представляет собой тример и является наиболее распространенным поверхностным белком, который функционально ответственен за адсорбцию и проникновение вирионов в клетку. Антитела к НА нейтрализуют инфекционность вируса и подавляют его гемагглютинирующую активность [4]. У вирусов высокопатогенного гриппа птиц НА может расщепляться фуриновыми протеазами, что позволяет вирусу активно размножаться в различных типах клеток и приводить к системной инфекции. НА вируса низкопатогенного гриппа птиц содержит один аргинин или лизин, который расщепляется только трипсиноподобными протеазами, присутствующие в эпителиальных клетках

дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, что приводит к инфекции, ограниченной этими тканями [34]. Мутация в сайте расщепления может увеличить вирулентность вируса. Белок нейраминидаза (NA) в виде тетрамеров шаровидной структуры обладает ферментативной активностью. В оболочку вируса гриппа А интегрированы также тетрамеры белка M2. Матриксный белок M2 формирует ионные каналы мембраны, обеспечивает условия для депротеинизации вируса при проникновении в клетку. Матриксный белок M1 является основным мостом между липидной мембраной и вирусным ядром нуклеопротеина, формирует внутренний слой оболочки вируса, придает устойчивость и жесткость внешней липидной оболочке [37, 115].

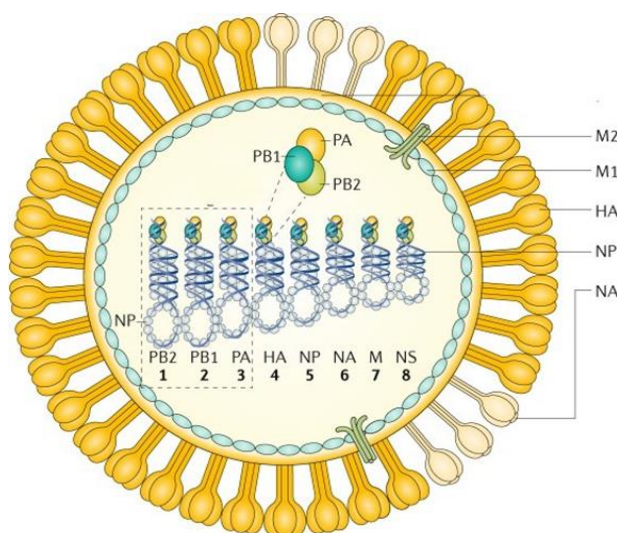


Рисунок 3 - Структура генома вириона вируса гриппа А [91]

Внутри вириона вируса гриппа А находится геном, который представляет собой одноцепочечную спиральную (-) РНК и содержит восемь сегментов генома, кодирующие одиннадцать белков (рисунок 3).

Геном представлен в виде рибонуклеопротеинового комплекса vRNP (нуклеопротеин в комплексе с геномной РНК вируса), который содержит фрагменты РНК, прикрепленные к основному структурному белку нуклеопротеину (NP), и три белка полимеразного комплекса: PB1, PB2 и PA [92]. Установлена кодирующая функция каждого фрагмента РНК: первый фрагмент РНК кодирует белок PB2, второй PB1, третий PA, четвертый HA, пятый NP, шестой NA, седьмой кодирует матриксные белки M1 и M2, восьмой неструктурные белки NS1 и NS2.

Антигенные свойства внутренних белков RNP вириона, которые не дают перекрёстных серологических реакций, определяют принадлежность вируса гриппа к роду. Белок виропорин PB1-F2, который модифицирует клеточные мембраны и участвует в апоптозе клеток-хозяев, представлен не во всех вирусах гриппа А [13, 149].

Внутренняя часть вириона также включает неструктурный белок NS2, известный так же как NEP. NEP (второй белок, кодируемым восьмым сегментом РНК) присутствует в количестве от 130 до 200 молекул на вирион и обеспечивает ядерный экспорт вирусной РНК в комплексе с NP [13]. Неструктурный белок NS1 обнаруживается только в инфицированных клетках, подавляет трансляцию митохондриальной РНК клетки, а также синтез и работу интерферона [97].

Геном вируса гриппа А имеет длину около 13 500 оснований. Впервые полная нуклеотидная последовательность штамма вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) была получена в 1982 г. [115].

2.5 Устойчивость вируса гриппа птиц во внешней среде и к физико-химическим факторам

Данные об устойчивости вирусов к факторам внешней среды приводит D.E. Stallknecht и др. [139]. В зависимости от физико-химических свойств воды передача вирусов может быть усилена или ограничена в естественных условиях обитания водоплавающих птиц. Исследования с использованием модели дистиллированной воды показали, что вирусы гриппа птиц наиболее стабильны при слабоосновном рН (7,4–8,2) и температуре ниже 17°C и низкой солености воды 0-20000 ppm [33]. Инфекционная активность вируса увеличивается по мере снижения температуры воды и по мере приближения рН к нейтральному или слабоосновному [96]. Вирусы могут сохранять свою инфекционную активность в воде при 17°C до 207 дней и при 28°C – около 102 дней. Выживание вирусов в помете составляет 105 сут в зимний период и 4-7 сут в летний период при температуре (20-32)°C [139]. Вирус способен относительно длительное время сохраняться в окружающей среде,

несмотря на слабую устойчивость к физико-химическим факторам. Jian Meng и др. изучали устойчивость вируса на поверхностях различных материалов (пластик, стекло, нержавеющая сталь) и обнаружили, что на инфекционную активность в большей степени влияют факторы окружающей среды, чем типы материалов. В условиях относительно высокой температуры (выше 25°C) и низкой влажности (менее 20%) на поверхности пластика вирусы сохраняли инфекционную активность дольше, чем на поверхностях стекла и нержавеющей стали [119].

Вирусы чувствительны к жирорастворителям, детергентам, формальдегиду, β -пропиолактону, быстро инактивируются при 56°C, УФ-облучении и снижении pH среды ниже 5. Под действием ультрафиолетового облучения вирус инактивируется в течение 5 минут, при температуре 55°C в течение 1 ч, при 60°C за 10 мин, (65-70) °C за 2-5 мин. В присутствии $MgCl_2$ вирус инактивируется быстрее, а $MgSO_4$ стабилизирует его. Гемагглютинирующая и инфекционная активность вируса сохраняются при минус 60°C несколько лет, а при 4°C – несколько недель. В крови и экссудатах без доступа света и воздуха при температуре минус 60°C инфекционные свойства вируса сохраняются более 6 лет. Гемагглютинирующие свойства более стабильны, чем инфекционные. Гемагглютинирующую и инфекционную активность можно сохранить, если добавить простой белок (протамин), квасцы или фосфат кальция или же обработать 35%-ным метанолом при температуре минус 5°C. Инфекционность вируса пропадает при обработке его окисдированными агентами (йодин), слабыми килотами, додецилсульфатом, гидроксиламином, ионами аммония. В лиофилизированном состоянии гемагглютинирующая активность вируса сохраняется на протяжении нескольких лет [4].

Вирус гриппа способен сохраняться в трупах и мясе более 1-2 месяцев, на поверхности субстрата при рассеянном свете – до 15 суток, при прямом солнечном свете – до 2 суток, в замороженных трупах – до 1,5 лет. Вирус обнаруживается во всех тканях и органах больных птиц, но в наибольших титрах – в крови и экссудатах. На перьях птиц вирус оставался жизнеспособным до 20 суток. В мясе птицы при pH 7 вирус выживает в течение 6 мес при 4°C [6].

Perlas A. и др. изучали устойчивость вируса низкопатогенного гриппа в искусственных водоемах и обнаружили, что в пресноводном водоёме вирусы оставались жизнеспособными от 1 до 14 суток при температуре воды (10 – 18)°C. В почве и на разных поверхностях при защите от солнечного света возбудитель сохранял активность от 1 до 14 суток при температуре (4–30)°C [120].

2.6 Эпизоотология

Основными естественными хозяевами и природными резервуарами вирусов большинства подтипов гриппа птиц являются популяции диких перелетных и водоплавающих птиц, особенно из отрядов Гусеобразные (*Anseriformes*), в частности семейства утиных (*Anatidae*) и Ржанкообразные (*Charadriiformes*). Вирусы гриппа птиц были обнаружены от более 105 видов птиц [68]. Наибольшее значение имеют представители подсемейств *Anatinae* - кряква и *Aythyae* – нырки (красноголовые, хохлатые). Источником инфекции при гриппе является больная птица. Дикие и домашние водоплавающие птицы могут быть бессимптомными вирусоносителями. Основным механизмом передачи вируса в естественных условиях является фекально-оральный. Заболеваемость вирусом гриппа носит сезонный характер. Наибольший процент выделения вирусов гриппа от птиц наблюдали в осенний период, особенно часто от молодых особей. Возрастные различия в распространенности вируса были выявлены у крякв и евразийских крякв (*Anas penelope*) в Европе, при этом у молодых особей распространенность вируса составила 6,8%, у взрослых - 2,8% [6, 139]. Многочисленные исследования по мониторингу проводились в зимний период, во время гнездования и на путях пролёта в Европе, Азии, Австралии, Америке. В Америке от уток в период гнездования вирусы выделены в 30%, а на зимовках — в 1–2%. При сезонных миграциях, в том числе трансконтинентальных, во время остановок птицы экскретируют вирус в местные водоёмы, где вирусы могут сохраняться до месяца, а в холодное время года — в течение всего зимнего периода. Во время таких

остановок заражение алиментарным путем через загрязненную воду происходит между популяциями разных видов птиц, в том числе и сельскохозяйственных [6].

Спектр хозяев определяется восприимчивостью диких видов птиц и существующих между ними генетических и эколого-географических различий. К факторам, влияющим на передачу инфекции в естественных условиях, относятся среда обитания, тип кормления и особенности миграции птиц. В результате проводимых мониторинговых исследований сведения о распространении вирусов гриппа регистрируют от исследования тех видов птиц, которые наиболее широко распространены и легко добываемы. В плане носительства вирусов гриппа наблюдаются различия даже в пределах одного отряда. В отряде Гусеобразные наибольший процент инфицирования был зарегистрирован среди представителей подсемейства Настоящие утки (*Anatinae*) у речных уток, у нырковых уток и гусей. Среди представителей рода речные утки (*Anas*) наибольший процент вирусывыделения был отмечен среди крякв (*Anas platyrhynchos*), шилохвости (*Anas acuta*) и чирка-свистунка (*Anas crecca*). У представителей отряда Ржанкообразные наблюдается более низкий процент инфицирования. Из четырех семейств: бекасовые (*Scolopacidae*), ржанковые (*Charadriidae*), чайковые (*Laridae*) и чистиковые (*Alcidae*) были изолированы вирусы гриппа, но чаще положительные результаты выявляли у чаек (*Laridae*) [94]. Для водоплавающих птиц фекально-оральный механизм передачи является основным.

Вероятной причиной заноса инфекции в стада домашней птицы является контакт дикой и домашней птицы на естественных водоемах. Алиментарным источником вирусной инфекции в природе является вода. В хозяйствах промышленного типа возможна контактная передача возбудителя через инфицированные предметы, например тару (лотки для тушек и яиц), а также инвентарь, оборудование, помёт, корма, товарная продукция (тушки птиц, яйца, пух, перо), полученная в инкубационный период или от клинически больной птицы. На промышленных предприятиях при клеточной системе содержания основной механизм передачи – аэрогенный, путь передачи - воздушно-капельный. Заболеваемость птицы варьирует в зависимости от условий содержания птицы,

иммунного статуса поголовья, наличия коинфекции вирусной или бактериальной этиологии.

С 90-х годов прошлого века отмечено увеличение количество случаев заражения разных видов птиц вирусами гриппа подтипа Н9, которые способны вызывать заболевания как в легкой, так и в тяжелой форме. В Китае в период с 1996 по 2000 год доля поголовья кур, зараженного вирусом Н9N2, достигла 93,89%. В период с 2000 по 2003 год в ОАЭ вирус Н9N2 вызывал заболевание у перепелов с 30% снижением яйценоскости и 36% летальностью у кур-несушек. Массовые заболевания вирусом Н9N2 среди цыплят были зарегистрированы в Иране с 1998 по 2001 гг. с 20-60% летальностью у бройлеров [110]. Взрослая птица в течении 2-х месяцев после переболевания теряла яичную продуктивность на 40-60% [50, 53, 131].

Торговая деятельность вносила очевидный вклад в распространение болезни. В ходе исследований на рынках живой птицы было зафиксировано увеличение заболеваемости вирусом Н9N2 во Вьетнаме на 3,5% [123], в различных провинциях Китая на 10% [103, 104], в Бангладеш и Пакистане около 10% [100, 126]. Распространению инфекции также способствовала торговля между фермами и мелкими хозяйствами [114].

Анализ эпизоотологических данных показал, что вирус низкопатогенного гриппа птиц подтипа Н9 создает угрозу для промышленного птицеводства из-за широкого распространения.

2.7 Патогенез болезни, клинические признаки, патологоанатомические изменения при низкопатогенном гриппе птиц

Важным фактором, определяющим клеточный тропизм и патогенность вируса гриппа, является последовательность и типы аминокислот в сайте расщепления гемагглютинина (НА). Аминокислотные замены в НА могут оказывать влияние на тканевой тропизм. Мутации в белках PB2, PB2, PA, NS1 и NA приводили к увеличению патогенности и расширению видовой специфичности

вируса. В области сайта связывания с рецептором аминокислотные замены высокопатогенных вирусов влияют на связывание с рецепторами α -2,6 сиаловой кислоты млекопитающих. У птиц основными рецепторами для связывания служат α -2,3 рецепторы сиаловой кислоты, которая в больших количествах вырабатывается в клетках эпителия дыхательной и пищеварительной систем [68, 129]. В транскрипцию и репликацию РНК вовлечено множество вирусных и клеточных факторов. Вирусы низкопатогенного гриппа птиц одинаково хорошо реплицируются как в эпителии кишечного тракта, так и в дыхательных путях [129]. После размножения вирус в высоких концентрациях выделяется в окружающую среду [35, 129].

От вирулентности возбудителя гриппа зависит длительность инкубационного периода, который варьирует от нескольких часов до нескольких суток [129].

Вирус гриппа у диких водоплавающих птиц передается, как правило, фекально-оральным путем, через воду, загрязненную пометом инфицированных водоплавающих птиц, таких как утки, чайки, гуси и лебеди. Естественными носителями гриппа являются дикие водоплавающие птицы, в основном из отрядов *Anseriformes* (гуси, утки, лебеди) и *Charadriiformes* (чайки, крачки, кулики и бескрылые гагарки). На птицеводческих комплексах вирус гриппа может распространяться как фекально-оральным, так и воздушно-капельным путём [129].

Клинические признаки при низкопатогенном гриппе у птиц варьируют в зависимости от вида птиц. У диких водоплавающих уток инфекция протекает бессимптомно, у кур и индеек в птицеводческих комплексах клинические проявления болезни, как правило, связаны с воспалением дыхательных путей, снижением яичной и мясной продуктивности [146]. В родительских стадах индеек при инфекции вирусом H9N2 регистрировали 10% гибель и снижение яичной продуктивности до 45% [117]. У Курообразных (*Galliformes*) низкопатогенный грипп, вызванный подтипом H9, вызывал потерю веса у молодняка и респираторные проявления болезни, при этом смертность составляла 2–3%; у несушек отмечали снижение яйценоскости и регистрировали респираторные

признаки инфекции, но в меньшей степени выраженности [41, 89]. Общие респираторные признаки включали серозный ринит, синусит и конъюнктивит [42, 48].

В большинстве случаев на сельскохозяйственных предприятиях вирус провоцирует развитие респираторной формы заболевания. Тяжесть проявления клинических симптомов увеличивается от наличия вторичных вирусных, бактериальных или грибковых патогенов и при состоянии иммуносупрессии на фоне применения живых вакцин [53, 110].

Nagah Arafat и др. при коинфекции *Salmonella enteritidis* и вирусом H9N2 наблюдали снижение массы тела и увеличение падежа у цыплят [52]. Ассоциированная форма болезни, вызванной вирусом H9N2, вирусом инфекционного бронхита кур и микоплазмами была зарегистрирована в Иране (1998-2001 гг.), и характеризовалась поражением органов респираторного тракта и высокой смертностью 20–60% [110].

В Китае в ходе мониторинговых исследований на рынках живой птицы был обнаружен вирус H9N2 у других видов домашней птицы (перепелок, куропаток, фазанов и цесарок) [28, 64]. Islam A. и др. отмечали, что перепела являются промежуточными хозяевами, в организме которых вирус приобретает свойство преодолевать межвидовой барьер [20, 62]. В 2006 году в ЮАР низкопатогенный грипп, вызванный подтипом H9, выявили у страусов. У птиц отмечали угнетенное состояние и отказ от корма [117].

С клиническими данными соотносились патологоанатомические признаки. При подостром течении болезни респираторной формы у птиц обнаруживали в воздухоносных мешках, трахее и бронхах фибринозный экссудат [110]. У индеек при вскрытии наблюдали оварииты и сальпингиты [41, 117,]. Osama Mahana с соавторами при экспериментальном заражении цыплят вирусом H9N2 и вирусом ИБК выявляли нефрит, гиперемию слизистых оболочек респираторного тракта, поражение альвеолярной ткани респираторных бронхиол с наличием экссудата [116]. Вирус H9N2, выделенный от кур в 2023 году, при экспериментальной

инфекции был выявлен в двенадцатиперстной кишке, печени и почках, что указывает на дальнейшее расширение тканевого тропизма этого вируса [46].

В основном естественное и экспериментальное заражение низкопатогенным гриппом связано с легкой формой заболевания птиц, но при ко-инфекции проявление клинических признаков зависит от многих факторов, в том числе от возбудителя инфекции, состояния иммунной системы организма, бактериальной инфекции.

2.8 Лабораторная диагностика гриппа птиц

Предварительный диагноз на грипп птиц устанавливают на основании клинических, патологоанатомических и эпизоотологических данных. Основаниями для подозрения на низкопатогенный грипп являются любые массовые отклонения от нормального состояния здоровья птиц (угнетение, изменение в поведении, снижение потребления корма и воды, снижение продуктивности, нарушение функций дыхательной и пищеварительной систем и пр.); выявление низкопатогенного гриппа в хозяйстве, из которого ввезены птицы, инкубационные яйца, продукция птицеводства и корма, в течение 21 календарного дня после дня осуществления их ввоза; обнаружение постинфекционных антител к возбудителю низкопатогенного гриппа. Отобранные биологические и (или) патологические материалы направляют в ветеринарную лабораторию для проведения исследований и постановки окончательного диагноза. Дифференциальная диагностика низкопатогенного гриппа птиц проводится с отравлениями и инфекциями, вызванными патогенами различной этиологии (ньюкасская болезнь, инфекционный ларинготрахеит, инфекционный бронхит, гемофилез, респираторный микоплазмоз, пастереллез птиц и другие острые инфекционные болезни). Диагноз на грипп птиц считается установленным, если выделен и идентифицирован вирус гриппа птиц или выявлен генетический материал возбудителя [3, 154].

Отбор проб биологического и (или) патологического материала при подозрении на грипп птиц проводят специалисты госветслужбы. Трахеальные

(ротоглоточные) и клоакальные смывы (или мазки), сыворотки крови отбирают от 25 голов птиц из одного птичника. От трупов птиц в лабораторию направляют головной мозг, селезенку, трахею, легкие, сердце, почки, участки кишечника вместе с содержимым, перевязанные лигатурами, - не менее 5 г. Участки кишечника отбирают отдельно от других внутренних органов. Допускается направление трупов птиц целиком. Пробы патологического материала помещают в «транспортную» среду (объемом 1-2 мл), содержащую антибиотики. Сборные пробы помета отбираются из птичника, мест скопления (обитания) диких, в том числе синантропных птиц: отбор проб осуществляется методом рандомизированной выборки. При наличии в птичнике менее 25 голов птиц пробы отбираются от каждой птицы. Отбор проб биологического материала от диких, в том числе синантропных, птиц должен проводиться в сроки охоты, в течение которых допускается добыча охотничьих ресурсов [3]. При упаковке и транспортировке проб соблюдают требования, установленные Ветеринарно-Санитарными Правилами и меры безопасности, предъявляемые к транспортировке биологических материалов, содержащих или подозрительных на содержание патогенов.

Лабораторные исследования проводят с использованием следующих методов: выделения возбудителя с его идентификацией в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), выявление генетического материала возбудителя с помощью молекулярно-генетических методов (полимеразно-цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), секвенирование), выявление антигена возбудителя методами иммуноферментного анализа (ИФА) и в реакции диффузионной преципитации (РДП), выявление антител к возбудителю различными методами (РТГА, в реакции нейтрализации (РН), ИФА, РДП) [3, 34].

Вирусовыделение. Выделение вируса гриппа птиц проводят на 9-11 суточных развивающихся куриных эмбрионах или культурах клеток (MDCK, ESK, первичные культуры клеток и др.) [142]. В соответствии с рекомендациями ВОЗЖ вирус гриппа птиц предпочтительно выделять методом инокуляции исследуемой суспензии смывов или органов в 9-11 суточные развивающиеся куриные эмбрионы

СПФ-кур в аллантоисную или амниотическую полости. Наличие гемагглютинирующего вируса в экстраэмбриональной жидкости устанавливают в реакции гемагглютинации (РГА) [154]. Положительные в РГА пробы дифференцируют от других гемагглютинирующих вирусов (парамиксовируса птиц, вирус синдрома снижения яйценоскости -76) и *Mycoplasma gallisepticum* [15].

Специфичность результатов РГА подтверждают в РТГА против ряда моноспецифических антисывороток к каждому из Н-подтипу вируса гриппа А [154]. Индикация вируса гриппа в культурах клеток и в куриных эмбрионах является «золотым» стандартом, но наиболее продолжительна по времени по сравнению с другими, например молекулярно-генетическими методами обнаружения РНК вируса гриппа А.

Оценка патогенности. В случае выделения вируса гриппа, особенно подтипов Н5 и Н7, в соответствии с руководством ВОЗЖ, определяют патогенность одним из методов: проводят биопробу и определяют индекс патогенности при внутривенном заражении. Биопробу проводят на минимум восьми восприимчивых 4-8-недельных цыплят, не имеющих антител к вирусу гриппа птиц. ГП считается высокопатогенным, если значение индекса патогенности при внутривенном заражении превышает значение 1,2 ($IVPI > 1,2$ (до 3)) и низкопатогенным, если значение $IVPI$ составляет от 0,0 до $\leq 1,2$. Индекс рассчитывается как среднее значение клинических показателей для каждой птицы в течении наблюдаемого 10-суточного периода наблюдения (т. е. 0 — если птица здорова, 1 — если больна, 2 — если очень больна или парализована, 3 — если мертва [154].

2.8.1 Молекулярно-генетические методы

Одним из самых чувствительных и быстрых методов для выявления вируса гриппа является полимеразно-цепная реакция (ПЦР). Среди методов молекулярно-генетического анализа для выявления в исследуемом материале генетических последовательностей вируса гриппа используют различные варианты обратно-

транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), в том числе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием систем праймеров на консервативные фрагменты генома вируса гриппа NP и M, позволяющие идентифицировать вирус всех подтипов HA [57]. При положительном результате применяют ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к различным частям гена гемагглютинина и к различным подтипам гемагглютининов. Результатом является выявление или исключение наличия в материале вируса с определённым подтипом гемагглютинина [138]. Аналогичным образом применяется и ОТ-ПЦР с геном нейраминидазы [19]. Кроме подтипов H5 и H7, представляющим первостепенное внимание при разработке методов молекулярной диагностики, выявления требуют вирусы низкопатогенного гриппа птиц подтипа H9. Авторами предложены методики мультиплекс-ПЦР для выявления подтипов H5, H7 и H9. Метод мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ менее предпочтителен в виду снижения чувствительности реакции из-за образования сложных димеров-праймеров [56]. В большинстве лабораторий применяют методы ОТ-ПЦР-РВ в соответствии с рекомендациями ВОЗЖ [154].

При положительном результате теста на выявление гена гемагглютинина проводят наработку фрагментов РНК, комплементарным вариабельным частям гена HA, и последующее их секвенирование.

Секвенирование представляет собой высокочувствительный и точный метод определения нуклеотидной последовательности РНК и ДНК в каждом из генов, присутствующих в геноме. На основе информации, полученной в результате секвенирования, можно увидеть изменения в структуре гена, сопоставить последовательность циркулирующего вируса с ранее выявленными вариантами, сравнить с последовательностью вирусов используемой вакцины и, таким образом, определить, насколько генетически близкородственны или похожи варианты вируса гриппа между собой, определить генетические изменения, которые влияют на свойства вируса. Достаточно замены одной аминокислоты на другую, чтобы повлиять на свойства вируса, такие как скорость передачи вируса, его чувствительность к противовирусным препаратам или средствам специфической

профилактики [141]. Филогенетический анализ с использованием секвенирования для определения уникальных генетических маркеров путем сравнения амплифицированных фрагментов гена НА с нуклеотидными последовательностями подтипов НА из базы данных GenBank позволяет получить предварительную информацию о происхождении идентифицированного вируса. К вирусам высокопатогенного гриппа относят вирусы с аминокислотной последовательностью сайта расщепления NA0 [113]. Раннее определение патогенности по маркерам вирулентности на сайте разрезания НА в циркулирующих вирусах помогает лучше контролировать грипп среди популяции птиц.

Полногеномное секвенирование дает максимально полный набор данных о структуре генетического материала, информацию о выявленных известных или ранее не встречавшихся генетических изменениях, которые могли стать причиной развития заболевания и позволяет детально оценить все индивидуальные генетические вариации. Полногеномное секвенирование вирусов включает глубокий анализ вирусного генома по разным параметрам, включая проверку возможного антигенного шифта у вновь выделенного вируса, наличие значимых аминокислотных замен в структуре вирусных протеинов, установление вероятных родительских форм и географического региона происхождения вируса. Важно провести оценку нескольких генов, так как вирусы гриппа обладают сегментированным геномом и являются реассортантами. Два вируса с одинаковым геном гемагглютинаина могут обладать разными генами внутренних белков. Данные полногеномного секвенирования можно использовать для разработки новых диагностических тестов [34].

Применение молекулярно-генетических методов позволяет одновременно исследовать большое количество образцов в более короткие сроки по сравнению с вирусовыделением в куриных эмбрионах. К недостаткам данных методов следует отнести высокую стоимость оборудования и расходных материалов.

2.8.2 Серологическая диагностика

В лабораторной диагностике важную роль играют серологические исследования. Для идентификации неизвестных вирусов может быть использована РДП, но ее чувствительность во многом зависит от концентрации и степени очистки антигенов. С помощью РДП также исследуют сыворотки крови птиц различных видов на выявление антител к вирусу ГП. Для определения типа выделенного вируса и выявления типоспецифических антител в сыворотках крови птиц применяют различные варианты ИФА, которые обладают большей чувствительностью, чем РДП [55, 102, 141]. Для выявления специфичных антител к вирусу ГП применяют реакцию нейтрализации в формате микронеutralизации, но этот метод трудозатратный в связи с использованием клеточной культуры [34].

Традиционным методом типирования нейраминидазной активности является РТНА, которая требует набора контрольных антигенов и ряда высококачественных моноспецифических антисывороток к каждому N-подтипу по нейраминидазе [154]. Постановка РТНА трудоемкая, занимает несколько дней и ее, как правило, применяют в референтной лаборатории.

Наиболее простым и высокочувствительным методом является РТГА. Принцип РТГА основан на взаимодействии антител с соответствующим антигенным вариантом вируса гриппа, что приводит к потере его агглютинирующих свойств и визуально проявляется оседанием эритроцитов. В соответствии с рекомендациями ВОЗЖ, РТГА применяют для идентификации подтипа гемагглютинирина и для оценки уровня специфических антител к вирусу гриппа птиц [154].

При оценке иммунного статуса птицы наряду с гуморальным иммунным ответом проводят исследования по оценке клеточного иммунитета, который также формирует резистентность к инфекционным заболеваниям. Клеточно-опосредованный иммунный ответ подразумевает накопление в организме клон Т-лимфоцитов, несущих специфические для данного антигена распознающие рецепторы, и ответственные за клеточные реакции иммунного воспаления. По

поверхностным гликопротеинам охарактеризованы CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляции Т-лимфоцитов. Т-клетки, несущие CD4⁺ маркеры, функционируют как регуляторные клетки (Т-хелперы), обеспечивая гуморальный иммунный ответ, в то время как с CD8⁺ маркерами работают как эффекторные (цитотоксические) клетки, определяя клеточный характер специфического иммунного ответа. Иммунофенотипирование Т-клеточных субпопуляций на ранних стадиях формирования иммунного ответа позволяет спрогнозировать его тип, динамику, предсказать эффективность и направление иммунных реакций, что важно для исследования резистентности к возбудителю гриппа птиц [12, 54, 88, 148]. Анализ представляющих интерес клеточных популяций проводят методом проточной цитофлуориметрии. В ее основе лежит проведение фотометрических и флуоресцентных измерений отдельных клеток, пересекающих одна за другой вместе с потоком жидкости лазерный луч монохроматического света. Флуоресцентные каналы используют для выделения популяции клеток с помощью моноклональных антител по клеточным маркерам или CD.

2.9 Заключение по обзору литературы

Анализ литературных данных показал циркуляцию вируса низкопатогенного гриппа птиц в популяциях домашних и диких птиц в странах Азии, Африки и Европы. При этом в мире преобладают изоляты подтипа H9N2. Информация по распространению вируса низкопатогенного гриппа птиц представлена в основном в научных публикациях, так как случаи выявления подтипа H9 не подлежат обязательному уведомлению в ВОЗЖ. Несмотря на низкую патогенность, грипп птиц, вызванный подтипом H9, на фоне коинфицирования с различными патогенами вызывает существенные экономические потери, связанные с повышенной выбраковкой, снижением яичной и мясной продуктивности. Рядом исследователей показано, что вирусы H9N2 способны преодолевать межвидовой барьер и инфицировать не только птиц, но и млекопитающих различных видов.

В Китае вирус H9N2 широко распространен и представлен двумя генетическими линиями Y280 и G1. Важной стратегией борьбы с заболеванием в Азии является вакцинация, но учитывая высокую вариабельность вируса, необходимо своевременно актуализировать вакцинные штаммы. Несмотря на предпринимаемые в России меры по контролю гриппа птиц, вирус H9N2 был выявлен в популяциях сельскохозяйственной птицы на Дальнем Востоке РФ. В связи с распространением заболевания в Российской Федерации возникла необходимость разработки высокоэффективных диагностических препаратов с соответствующим актуальным антигеном, которые позволили бы проводить постоянные мониторинговые исследования. Необходимо изучение антигенных и генетических свойств выделенных вирусов с целью их последующего применения для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики.

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Материалы

Вирус. Штаммы вируса гриппа птиц из «Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных» ФГБУ «ВНИИЗЖ» и изоляты вируса гриппа птиц подтипа Н9, выделенные из биоматериала от домашних, сельскохозяйственных и диких птиц на территории РФ в 2018-2025 гг.. В качестве материала использовали вируссодержащую аллантоисную жидкость эмбрионов СПФ-кур.

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

Лабораторные животные. Для определения биологических свойств изолятов вируса низкопатогенного гриппа птиц подтипа Н9 использовали клинически здоровых невакцинированных против гриппа птиц 6-недельных цыплят яичного направления. Для получения специфических сывороток в качестве доноров использовали здоровых кур в возрасте 30-60 суток, полученных из хозяйств, благополучных по инфекционным болезням.

Сыворотки крови. Материалом для исследований служили сыворотки крови различных видов диких, синантропных, сельскохозяйственных и домашних птиц с разным уровнем антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9.

Реактивы и специфические компоненты. Для приготовления растворов и буферных смесей использовали воду дистиллированную; бидистиллированную воду свободную от РНКаз; комплекты реагентов фирм «AppliChem», «Thermo Scientific», «Bio-Optica», «Southern biotech», «Seppic», «Molecular», «Синтол», «Алкор-био», «Евроген»; химические реактивы российского производства марки «ч.д.а.», «х.ч.»; среду FicollPaque[™] PLUS (Швеция); буфер BD FACS Flow (Becton, США); среду RPMI-1640 Medium (U.K.), среду ПСП, β -пропиолактон.

При выполнении работы применяли компоненты: термостабильную Taq ДНК-полимеразу *Thermus aquaticus* ДНК-полимеразу; РНК-зависимую ДНК-полимеразу

MLLV-ревертазу; смесь праймеров и TaqMan-зондов; 25мМ раствор хлорида магния; водный раствор дезоксинуклеозид-трифосфатов с концентрацией 25 мМ каждого; буфер для ПЦР (10X) («Синтол», Россия).

При выполнении работы применяли специфические компоненты: референтные антигены и сыворотки крови против 16 подтипов вируса гриппа птиц (H1-H16) производства «Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie» (IZSve, Италия) и «Royal GD» (GD, Нидерланды), референтные антигены и сыворотки крови против 8 серотипов парамиксовируса птиц (ньюкаслской болезни (НБ), Италия); нормальные сыворотки крови кур и кролика, не содержащие антител к вирусу гриппа птиц и ньюкаслской болезни; меченые моноклональные антитела CD45-FITC (SouthernBiotest, США), CD4-PE, CD8 α -PE, CD3-PE и Bu1a-PE (Serotec, США); гепарин (Россия), адъювант Montanide ISA-70 (Seppic, Франция).

Растворы и питательные среды. Для приготовления растворов с определенной концентрацией вещества использовали дистиллированную воду.

Применяли при выполнении работы: фосфатно-буферный раствор (ФБР), 0,01 М, pH 7,2-7,4 и 0,4 М, pH 5,9; физиологический раствор (0,15 М);

стабилизирующие растворы для лиофильной сушки: 20% желатин; 10% ГЛА; 50% сахарозу;

для инактивации вируса: 0,1% раствор бета-пропиолактона (Molecula, США);

для приготовления суспензии эритроцитов: 3% цитрат натрия, pH 7,2-7,4;

для постановки РТНА: раствор фетуина pH 5,9 (250 мг фетуина + 10 мл H₂O + 10 мл ФБР-0,4 М); раствор периодата (4,28 г М-периодат натрия + 38 мл H₂O + 62 мл концентрированной фосфорной кислоты); раствор арсенита натрия (10 г арсенита натрия + 7,1 г Na₂SO₄ + 100 мл H₂O растворить при нагревании и охладить + 0,3 мл концентрированной H₂SO₄); раствор тиобарбитуровой кислоты (3 г тиобарбитуровой кислоты + 35,5 г Na₂SO₄ + 500 мл H₂O растворить при нагревании);

Для проведения испытаний выделенных изолятов гриппа птиц подтипа Н9 на стерильность (отсутствие контаминации микоплазмами, бактериями и грибами)

использовали питательные среды: среда Сабуро (жидкая и агар), тиогликолевая среда, среда Каган МПА, МПБ и МППБ.

Наборы реактивов. Набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц иммуноферментным методом при тестировании проб в одном разведении (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 в реакции торможения гемагглютинации (ФГБУ «ВНИИЗЖ»); набор для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия); набор для секвенирования BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США); наборы для библиотек Nextera XT (Illumina), Nextera XT Index Kit (Illumina); набор для чистки фрагментов из геля Wizard (R) SV Gel («Promega», США).

Праймеры и зонды. В работе использовали системы праймеров и зондов для выявления РНК вируса гриппа птиц и идентификации подтипов H9 и N2 в образцах биоматериала в ОТ-ПЦР-РВ. Праймеры были синтезированы НПО «Синтол» (Россия).

Оборудование. В процессе выполнения работы было использовано следующее оборудование: бокс ламинарный с уровнем биологической безопасности не ниже класса II (Lamsystems); низкотемпературный холодильник с поддержанием температуры не выше минус 50°C (Sanyo, Nuve); холодильник бытовой с поддержанием температуры холодильной камеры не выше 8°C и морозильной камеры – не выше минус 15°C (LG); центрифуга Jouan KR 25i (Termo Election Corporation); ультрацентрифуга Sorvall WX Ultra 100 (Termo Election Corporation); проточный цитофлуориметр BD FACS Calibur (Becton, Dickinson, США); термостат-инкубатор с поддержанием температуры (37±2)°C и относительной влажности воздуха 50-90% (Sanyo, Япония); микроцентрифуга для пробирок объемом от 0,2 до 2 см³ и скоростью вращения не ниже 1500 мин⁻¹ (Hermle, Германия); спектрофотометр-ридер Sunrise-basic (Tecan); программируемый амплификатор для проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Rotor-Gene Q); генетический анализатор MiSeq (Illumina, США); автоматический секвенатор (Applied Biosystems); УФ-трансиллюминатор (Vilber

Lourmat); шейкер-инкубатор Es-20 (Biosan); инактиватор ИСА 45-100М (Медэк, Россия); вакуумный отсасыватель (Millipore); термостат (ДНК-Технология); установка для горизонтального электрофореза (BioRad); pH-метр Seven-Multi (Mettler Toledo); овоскоп; весы аналитические (Ohaus); дозаторы автоматические одноканальные и многоканальные переменного объема в пределах 0,001-1,0 см³ (Gilson, Eppendorf, Biohit, Thermo scientific); горелка газовая; стилет-пробойник.

3.2 Методы исследований

Выделение и культивирование вируса гриппа птиц проводили согласно «Методическим рекомендациям по выделению и идентификации вирусов гриппа птиц и ньюкаслской болезни в развивающихся эмбрионах кур», утвержденным в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [7]. Из исследуемого биоматериала готовили 10%-ную суспензию на стерильном ФБР (pH 7,2-7,4) и центрифугировали в течение 15 мин при 1000g. К надосадочной жидкости добавляли антибиотики, инкубировали при температуре 20°C в течение 60 мин и использовали для заражения 9-11 суточных куриных эмбрионов. От эмбрионов, погибших после 24 ч инкубации и более, отбирали экстраэмбриональную жидкость (ЭЭЖ) с целью проведения последующих исследований.

Идентификация вируса гриппа в РТГА и РТНА. Гемагглютинирующую активность исследуемых изолятов вируса гриппа птиц устанавливали в реакции гемагглютинации (РГА). Активность вируса в РГА должна быть не менее 4 log₂ согласно рекомендациям ВОЗЖ [154].

Идентификацию вируса гриппа птиц по гемагглютинирующему (НА) проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с референтными сыворотками против вируса гриппа птиц подтипов H1-H16 (IZISVe, Италия) в соответствии с «Методическими рекомендациями по выделению и идентификации вирусов гриппа птиц и ньюкаслской болезни в развивающихся эмбрионах кур», утвержденными в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [7]. Идентификацию по нейраминидазе (НА) проводили в реакции торможения нейраминидазной активности (РТНА) с референтными

сыворотками против вируса гриппа птиц подтипов N1-N9 (IZISVe, Италия) согласно «Методическим указаниям по определению нейраминидазного подтипа вируса гриппа птиц и антител к вирусу гриппа птиц в реакции ингибции нейраминидазной активности», утвержденным в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [11].

Определение титра инфекционной активности вируса гриппа птиц. Из исследуемого вирусного материала готовили ряд 10-кратных последовательных разведений, которые в объеме 0,2 см³ вводили в аллантоисную полость четырёх 9-11-суточным куриным эмбрионам. После проведения двух последовательных пассажей специфичность гибели подтверждали в РГА. Титр вируса в исследуемом образце определяли по методу Кербера и выражали в единицах ЭИД₅₀/см³ [15].

Определение вирулентности вирусов гриппа птиц проводили согласно рекомендациям ВОЗЖ по определению индекса патогенности вируса гриппа птиц [113].

Опыт проводили на десяти цыплятах 6-недельного возраста, неиммунных к вирусу гриппа птиц. Исследуемую 10%-ную вируссодержащую аллантоисную жидкость (активность в РГА не менее 4 log₂) на стерильном ФБР вводили внутривенно каждому из десяти цыплят в дозе 0,1 см³. За птицами проводили ежедневное наблюдение в течении 10 суток и учитывали клиническое состояние каждой птицы при помощи коэффициента: 0 – птица здорова; 1 – птица больна (отмечены слабовыраженные признаки заболевания, такие как угнетение, отказ от корма и воды, цианоз кожи или ее производных, нарушения со стороны респираторного или пищеварительного тракта, нервные явления); 2 – птица тяжело больна (одновременно наблюдали несколько ярких клинических признаков болезни); 3 – гибель птицы. Индекс патогенности вычисляли по формуле:

$$IVPI = \frac{\sum_{i=1}^{10} (B_i \cdot 1 + TB_i \cdot 2 + P_i \cdot 3)}{10 \cdot N}$$

где B – число больных в сутки i;

TB – число тяжелобольных в сутки i;

P – число погибших в сутки i;

N – общее число птиц в эксперименте.

Изолят вируса, индекс патогенности которого более 1,2 признавали высоковирулентным.

Инаktivация вируса гриппа. Инаktivацию вируса гриппа проводили с использованием β -пропиолактона в соответствии с рекомендациями ВОЗЖ [113].

Гипериммунные сыворотки крови получали в соответствии с «Методическими указаниями по получению гипериммунных сывороток крови кур к вирусу гриппа птиц» утвержденными в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [11].

Определение титра антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови птиц в РТГА. Перед постановкой исследуемые сыворотки инаktivировали в течение 30 мин. при 56°C для удаления термолабильных ингибиторов.

РТГА проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по определению титра антител к вирусу гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации», утвержденными в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [11].

Для постановки РТГА готовили рабочую дозу антигена (4 ГАЕ), исходя из его титра. Пробы испытуемых сывороток и забуференного физиологического раствора вносили в лунки планшета в объеме 0,025 см³. В ряд последовательных двукратных разведений (с 1:2 до 1:4096) во все лунки планшета вносили рабочее разведение антигена в объеме 0,025 см³, осторожно встряхивали и после 30 минут контакта сыворотки с антигеном при комнатной температуре (20-25) °C в каждую лунку добавляли по 0,025 см³ 1% суспензии эритроцитов. Через 30 минут учитывали результаты реакции.

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., США).

Молекулярно-генетические методы исследования. Выделение суммарной РНК осуществляли набором «РИБО-преп» согласно инструкции производителя.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Проводили согласно «Методическим рекомендациям по выявлению РНК вируса гриппа птиц типа А методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени» [9], «Методическим рекомендациям по выявлению РНК вируса гриппа

птиц подтипа Н9 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2018) и «Методическим рекомендациям по выявлению РНК вируса гриппа птиц подтипа N2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени» [8], утвержденным в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Классическую ПЦР проводили согласно «Методическим рекомендациям по определению первичной структуры гена Н изолятов вируса гриппа птиц подтипа Н9 с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования» [10].

Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена НА осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), согласно инструкции производителя.

Полногеномное секвенирование осуществляли с помощью генетического анализатора MiSeq (Illumina, США) в соответствии с инструкцией к прибору. Для приготовления библиотек использовали коммерческие наборы Nextera XT и Nextera XT Index Kit (Illumina, США). Для биоинформатической 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/>). Для идентификации отдельных контигов при использовании алгоритма сборки de novo был использован онлайн сервис Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

В работе использовали нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов вируса гриппа птиц подтипа Н9, опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) и платформу EpiFlu (<https://www.gisaid.org/>).

Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit, версия 7.0.5.3. Выравнивание последовательностей выполняли с помощью программы множественного выравнивания ClustalW. Построение филогенетического дерева осуществляли с помощью алгоритма NJ в реализации пакета MEGA, версия 7.06.

Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов методом прочной цитофлуориметрии. Выделение лимфоцитов из периферической крови кур проводили по стандартной методике [6] с использованием среды для разделения лимфоцитов FicollPaquetm PLUS (BioWest). Подготовку проб для выявления поверхностных маркеров лимфоцитов осуществляли с использованием меченых моноклональных антител CD45-FITC, CD4-PE, CD8 α -PE, CD3-PE и Bu1a-PE (Southern biotech, США) в соответствии с «Методическими указаниями по подготовке проб для иммунофенотипирования и количественной оценки субпопуляций лимфоцитов с использованием проточной цитофлуориметрии» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2008). Пробы лимфоцитов в объёме 50 мкл вносили в микропробирки в нескольких повторностях (в зависимости от количества используемых панелей антител). Добавляли по 2 мкл моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромом, и инкубировали в течение 30 мин при температуре 4-8°C. Не связавшиеся моноклональные антитела удаляли центрифугированием с фосфатно-буферным раствором в течение 10 мин при 260 g. Количественный анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (Becton, Dickinson, США). Измерение и обработку полученных результатов осуществляли с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro 1.0.

3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.3.1. Обнаружение и выделение вирусов гриппа птиц подтипа Н9

3.3.1.1. Выявление и идентификация вирусов гриппа птиц подтипа Н9 в образцах биоматериала птиц. 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. В 2018 году в Приморском крае Дальневосточного ФО, в 2019 году в Челябинской области Уральского ФО и в некоторых субъектах Сибирского ФО в птицеводческих хозяйствах регистрировали повышенный отход птицы и снижение продуктивности в связи респираторным течением болезни. В пробах биоматериала из птицеводств этих регионов был выявлен вирус Н9N2.

В период с 2018 по 2025 год вирус Н9N2 выявляли у сельскохозяйственных и диких видов птиц из различных регионов РФ (рисунок 4).



Рисунок 4 - Распространение вируса гриппа птиц подтипа Н9 в РФ в 2018-2025 гг. (красный цвет- регион, в котором выявлен вирус Н9N2).

В период с 2018 по 2025 год методом ОТ-ПЦР-РВ генетический материал вируса гриппа типа А был выявлен в 1570 пробах биологического материала, вирус Н9N2 идентифицирован в 77 пробах (таблица 2).

Таблица 2 - Выявление вируса Н9N2 в пробах биоматериала, полученного в 2018-2025 гг. в ОТ-ПЦР-РВ

№	Субъект РФ/ Государство	Вид птицы	Дата	Количество положительных результатов в ОТ-ПЦР-РВ
1	Приморский край	курица	2018	8
2	Приморский край	курица	2018	1
3	Приморский край	курица	2018	1
4	Амурская обл	дикая утка	2018	1
5	Респ.Таджикистан	курица	2018	1
6	Челябинская обл	курица	2019	8
7	Забайкальский край	курица	2019	3
8	Респ. Дагестан	курица	2019	1
9	Челябинская обл	курица	2020	5
10	Волгоградская обл	курица	2020	8
11	Пензенская обл.	курица	2020	6
12	Самарская обл.	курица	2021	6
13	Владимирская обл.	кряква	2021	2
14	Свердловская обл	курица	2021	2
15	Удмуртская Респ.	курица	2021	1
16	Томская обл.	чирок	2022	1
17	Амурская обл.	курица	2023	3
18	Свердловская обл.	курица	2023	9
19	Волгоградская обл.	курица	2024	1
20	Донецкая Народная Республика	фазан	2024	2
21	Московская обл.	дикая водоплавающая птица	2024	7
Всего проб:				77

Таким образом, факты циркуляции вируса Н9N2 среди птиц сельскохозяйственного назначения установлены в субъектах Дальневосточного, Центрального, Уральского, Южного, Сибирского, Северо-Кавказского и Приволжского федеральных округов РФ, а также в Республике Таджикистан.

Среди диких птиц вирус Н9N2 был выявлен в биоматериале от кряквы и других водоплавающих птиц Центрального, Сибирского, Дальневосточного ФО и фазанов Южного ФО.

3.3.1.2. Выделение изолятов H9N2. Положительные в ОТ-ПЦР-РВ пробы суспензий биоматериалов инокулировали в аллантоисную полость 9-11 суточным куриным эмбрионам. После проведения трех последовательных пассажей было выделено 15 изолятов H9N2. Для всех изолятов определяли инфекционную и гемагглютинирующую активность (таблица 3).

Таблица 3 - Выделение изолятов H9N2 в куриных эмбрионах

№	Федеральный округ РФ/ страна	Название изолята	Средний титр гемагглютинирующей активности, lg ЭИД ₅₀ /см ³ (n=3)	Средний титр инфекционной активности, lg ЭИД ₅₀ /см ³ (n=3)
1	Южный ФО	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 ФО	A/chicken/Dagestan/4633/2019 H9N2	7,0±0,00	8,3±0,12
4	Приволжский ФО	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 ФО	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 ФО	A/chicken Zabaikal/2137/2019 H9N2	8,0±0,00	10,13±0,12
12	Дальневосточный ФО	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	Р. Таджикистан	A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 H9N2	8,3±0,33	8,25±0,13

Идентификация в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) со специфическими сыворотками H1-H16 и в реакции торможения нейраминидазной активности (РТНА) с референтными сыворотками N1-N8 подтвердила принадлежность выделенных патогенов к подтипу H9N2.

3.3.2 Молекулярно-генетические свойства изолятов

3.3.2.1. Филогенетический анализ по гену гемагглютинина вирусов гриппа птиц подтипа Н9. Методом секвенирования и сравнительного анализа была определена структура фрагмента гена гемагглютинина (НА) вирусов Н9Н2 и их принадлежность к генетическим линиям (рисунок 5).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit с использованием международной базы данных GenBank по гену НА. В результате сравнения нуклеотидных последовательностей вирусов, выявленных в 2018-2025 гг., было установлено, что вирусы от домашних птиц из Приморского края (A/chicken/Primorsk/3124/2018, A/chicken/Primorsk/419/2018, A/chicken/Amur/1666/23) относились к группе Y280 и имели генетическое сходство с вирусами Н9Н2, выделенными в странах Юго-Восточной Азии (Китай, Лаос, Южная Корея, Малайзия) в 2018-2023 гг. Вирусы группы Y280 остаются доминирующими вирусами на территории Юго-Восточной Азии и формируют большую относительно однородную генетическую группу (рисунок 6).

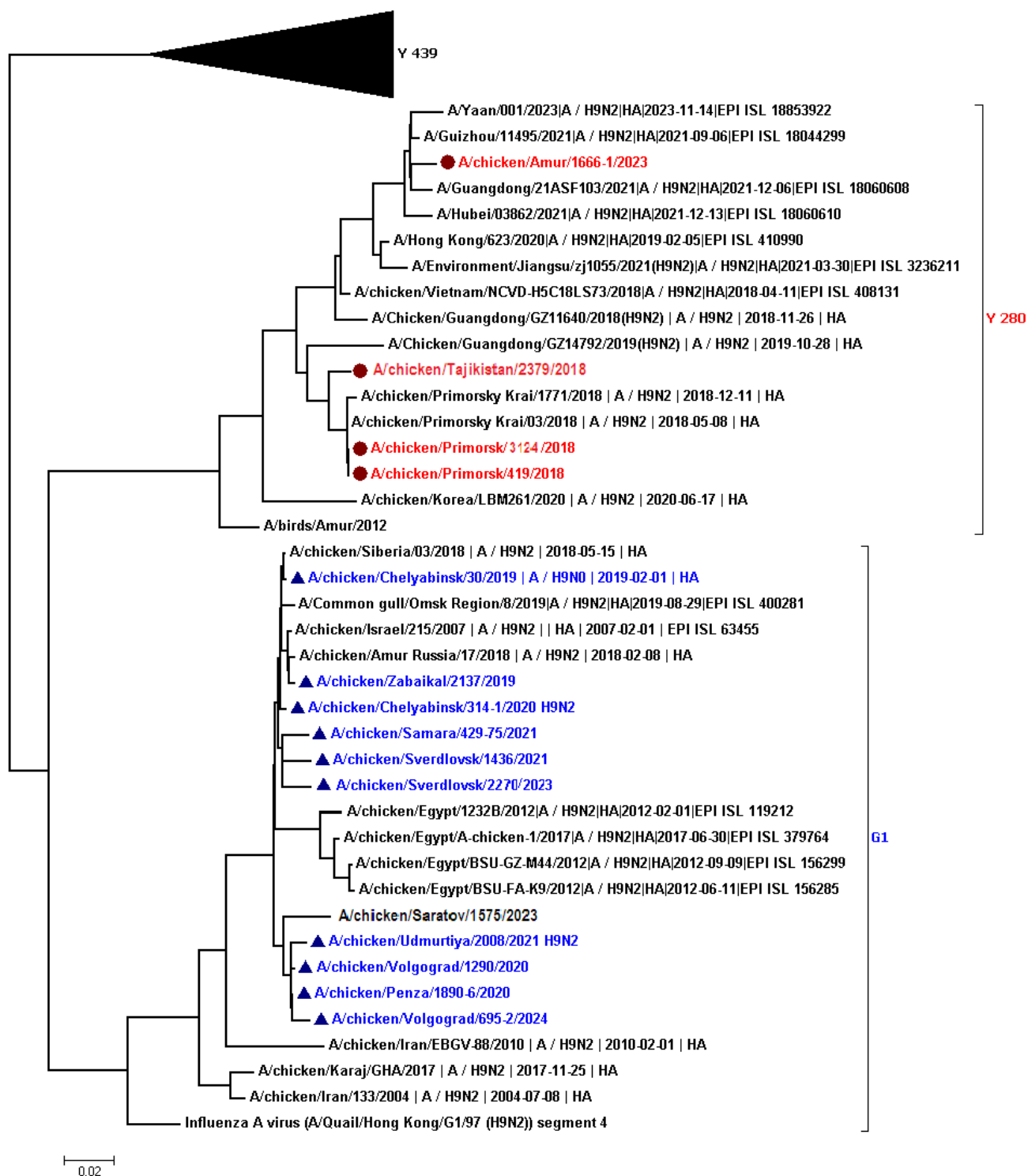


Рисунок 5 - Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена HA (1-1539 п.н. ОРС) вируса H9N2.

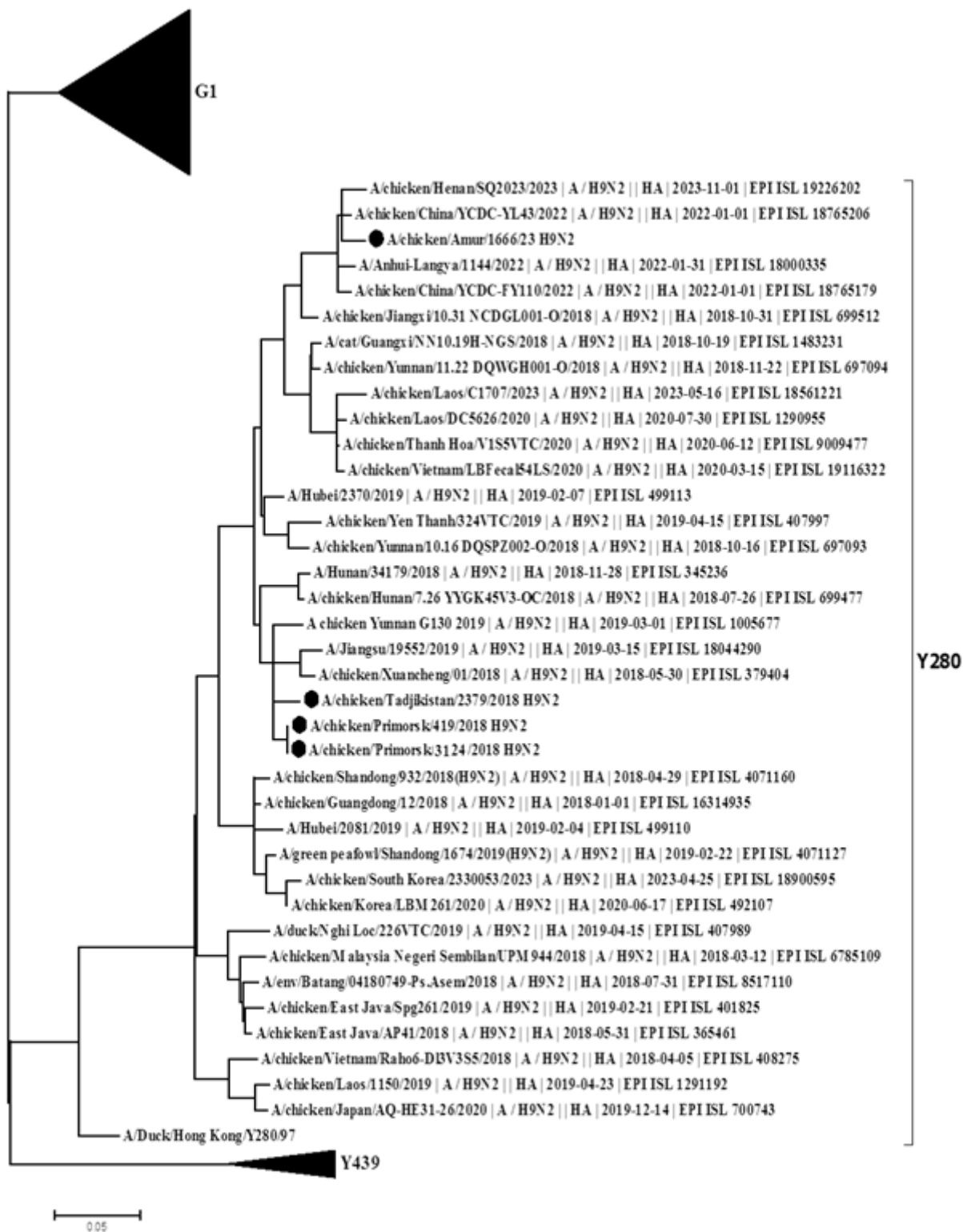


Рисунок 6 - Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена НА (1-1539 п.н. ОРС) вируса H9N2 (генетическая группа Y280).

Вирусы H9N2, выявленные на птицекомплексах Челябинской области (A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 и A/chicken/Chelyabinsk/314-1/2020) и Забайкальского края (A/chicken/Zabaikal/2137/2019) принадлежали к генетической группе G1 и филогенетически имели близкое родство с изолятами H9N2, выявленными на территории стран Ближнего Востока в 2007-2010 гг. (рисунок 7). Возможно, распространение вируса H9N2 в России может быть связано с недостаточным контролем за применением вакцины на основе штамма A/chicken/Israel/215/2007. Проведенный анализ по гену НА показывает, что в настоящее время генетическая группа G1 получает все большее распространение. Вирусы данной группы формируют отдельные топологические кластеры на филогенетическом дереве. При этом обособленность вирусов группы G1, вызвавших эпизоотию в странах Африки в 2018-2021 гг., указывает на независимую эволюцию этих вирусов. Кроме этого, установлена обособленность вирусов группы G1, выявленных в странах Южной Азии (Пакистан, Индия, Бангладеш) [21, 70].

Были отмечены случаи выявления представителей корейской группы Y439 в материале от дикой утки из Амурской (A/duck/Amurskaya/3122/2018) и Владимирской областей (A/mallard/Vladimir/1239/2021).

Таким образом, на территории РФ в 2018-2025 гг. зарегистрированы случаи заражения птиц сельскохозяйственных предприятий вирусами H9N2 генетических групп Y280 и G1. Случаи инфицирования домашней птицы вирусами группы Y439 отмечены не были.

Принимая во внимание, что вирусы низкопатогенного гриппа в природе могут длительное время циркулировать среди дикой птицы, не вызывая эпизоотий, актуальным является полногеномное секвенирование подобных изолятов. Основной целью полногеномного секвенирования вирусов гриппа является глубокий анализ вирусного генома по разным параметрам, включая проверку возможного антигенного шифта у вновь выделенного вируса, наличие значимых аминокислотных замен в структуре вирусных протеинов, установление вероятных родительских форм и географического региона происхождения вируса.

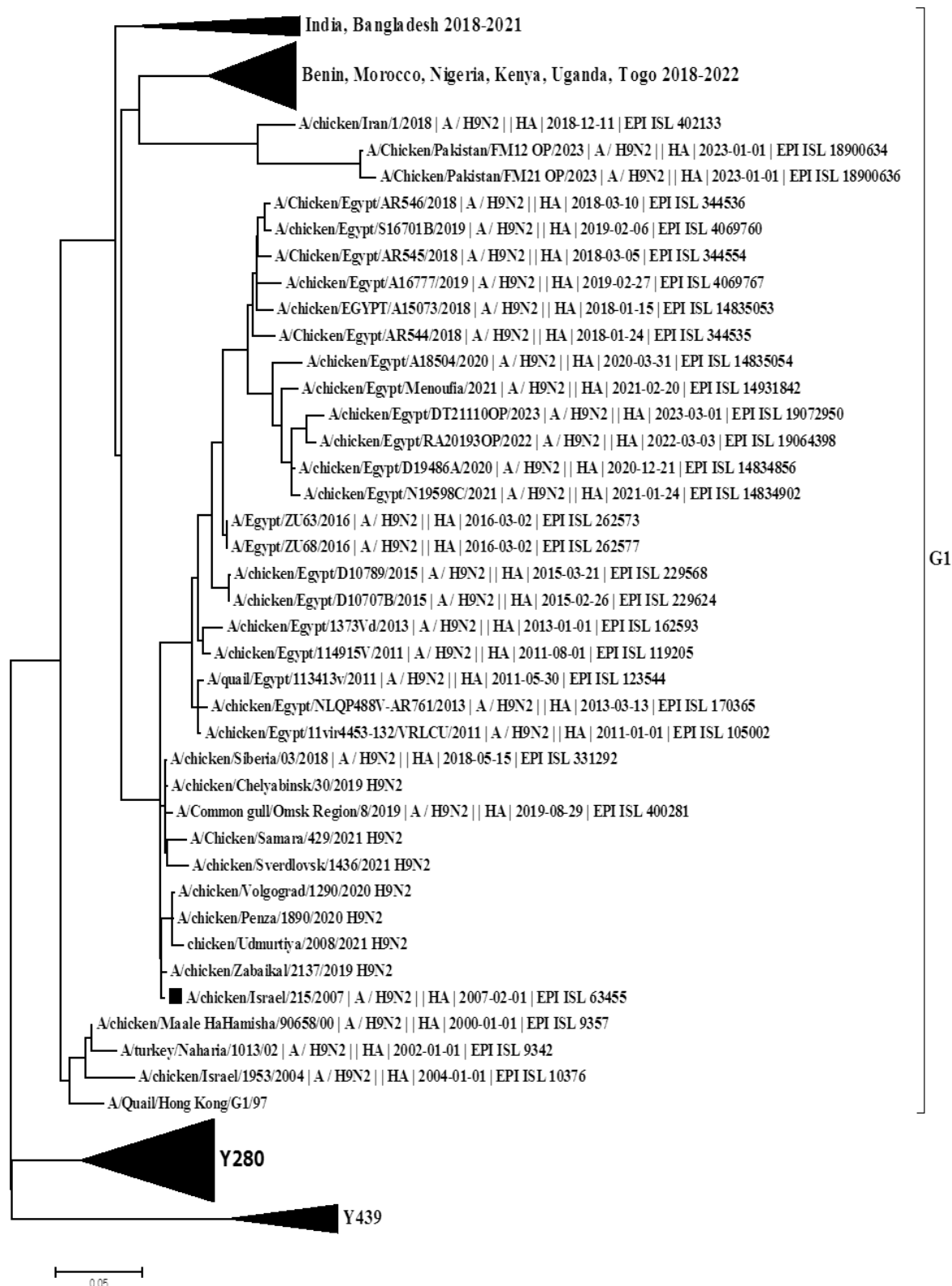


Рисунок 7 - Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена HA (1-1539 п.н. ОРС) вируса H9N2 (генетическая группа G1).

Изучение вируса гриппа птиц из разных генетических групп представляет особый интерес ввиду возможной адаптации изолятов вируса гриппа птиц к инфицированию млекопитающих. Для вируса H9N2 продемонстрирована совместимость генов с другими подтипами вируса гриппа А и показана возможность формирования реассортантов с другими подтипами, способные преодолевать межвидовой барьер и заражать млекопитающих, включая человека. Учитывая имеющуюся информацию о выделении от человека в 2016 г. вируса H9N2 птичьего происхождения, без выявления реассортаций сегментов генома, а также выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 среди населения Китая, необходимо тщательно изучать случаи заноса вируса на новые территории.

3.3.2.2 Сравнительный анализ генома вирусов H9N2 генетической группы Y280. Методом секвенирования определены полные нуклеотидные последовательности генома вирусов A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2, A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 H9N2 и A/chicken/Amur/1666/23 H9N2. Проведено сравнение последовательностей всех сегментов генома с последовательностями, опубликованными в базе данных GenBank, а также с последовательностями вирусов H9N2, выделенных от домашних и диких птиц на территории Израиля, России, Египта, Ливана, Китая, и вирусов H7N9, выделенных в 2014 г. в Китае, и с нуклеотидными последовательностями вирусов гриппа, выделенных от человека в 2017 году на территории Китая. Генотипирование вируса показало принадлежность изолятов A/chicken/Tadjikistan/2379/2018, A/chicken/Primorsk/419/2018, A/chicken/Amur/1666/23 к доминирующему на территории Китая генотипу G57. 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 М клада 3, ген NS клада 7, что характерно именно для генотипа G57 [81]. Выявление вируса гриппа птиц генотипа G57 в республике Таджикистан указывает на его проникновение на новые территории, где ранее он не регистрировался.

При анализе вирусной нейраминидазы у изолята A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 была выявлена дополнительная делеция одной аминокислоты в позиции 34. Возможные функциональные изменения вирусной нейраминидазы для данной мутации не описаны. Тем не менее согласно литературным данным, изменения в длине стебля вирусной нейраминидазы может приводить к изменениям функционального центра, формируемого тетрамером вирусных нейраминидаз. Высокое генетическое сходство вирусов A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 и A/chicken/Primorsk/419/2018 ставит вопрос о возможности распространения вирусов группы Y280 через территорию Сибири. В Приморском крае вирус был выделен весной 2018 г., а в Республике Таджикистан он был обнаружен осенью 2018 г. Возможно, географическое распространение вируса связано с осенней миграцией птиц из Сибири. В таком случае вирусы генетической группы Y280 могут быть наиболее широко распространены, чем мы предполагаем.

В результате полногеномного секвенирования и последующего анализа полученных данных было установлено, что вирусы генетической группы Y280 подвергаются активной генетической реассортации. Стоит отметить, что реассортация геномных сегментов происходит как внутри подтипа H9N2, так и с участием вирусов других подтипов с вероятным преодолением межвидового барьера. Установлено, что изученные вирусы имеют высокий уровень генетической идентичности по отдельным сегментам с изолятами вируса гриппа, выделенными от людей. Наиболее опасной выглядит возможность реассортации между подтипами H9N2 и H7N9. Так, при анализе всех сегментов генома изолята A/chicken/Primorsk/419/2018 и A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 было выявлено высокое сходство по отдельным сегментам генома с различными изолятами вируса подтипа H7N9 (таблица 4).

Однако проследить реассортацию вновь выделяемых вирусов гриппа очень затруднительно. Так, например, при анализе гена PB2 было найдено более 500 нуклеотидных последовательностей гена PB2 с уровнем нуклеотидной идентичности не менее 97%. Филогенетический анализ показал, что ген PB2 с

похожей нуклеотидной последовательностью встречается не только у вирусов H9N2 и H7N9, но и среди представителей H10N8, H10N6, H5N6, H9N6.

Таблица 4 - Уровень генетической идентичности изолята A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2 по разным генам

Изоляты вируса (подтипы H9N2 и H7N9)	Сравниваемый ген, %					
	PB1	PB2	PA	NP	M	NS
A/chicken/Tajikistan/2379/2018	99,1	99,2	97,0	99,1	99,6	99,5
A/Anhui-Luijiang/39/2018 (H9N2)	99,1	96,6	96,6	97,6	98,4	97,3
A/Hunan/42088/2017 (H9N2)	94,5	96,6	96,9	99,6	96,4	98,3
A/Fujian-Sanyuan/2881/2019 (H9N2)	96,6	96,0	97,3	98,8	98,7	97,4
A/Hunan/34179/2018 (H9N2)	94,6	96,0	96,6	99,0	99,4	97,7
A/Hebei/28939/2017 (H7N9)	96,6	99,0	97,5	93,6	99,1	97,8
A/Inner Mongolia/29169 (H7N9)	96,6	98,9	97,5	93,7	99,0	97,8
A/Inner Mongolia/Tongliao29169/2017 (H7N9)	96,6	98,9	97,5	93,7	99,0	97,8
A/Beijing/39450/2016 (H7N9)	94,5	98,3	97,3	97,1	98,7	98,6
A/Changsha/34/2017 (H7N9)	96,1	97,8	96,9	97,1	98,9	98,8
A/Henan/32240/2017 (H7N9)	98,9	96,6	96,4	93,7	98,6	97,7
A/Fujian/45970/2016 (H7N9)	98,7	97,5	99,1	93,7	99,2	98,5
A/Jiangsu/08193/2017 (H7N9)	98,5	96,9	97,7	93,9	99,1	97,7
A/Shandong/19419/2017 (H7N9)	98,5	93,9	97,7	93,7	99,1	97,8
A/Liaoning/44068/2016 (H7N9)	96,7	94,0	99,3	93,9	99,2	98,3
A/Tianjin/43917/2016 (H7N9)	96,6	93,9	99,3	94,1	99,4	98,4
A/Zhejiang/3/2017 (H7N9)	97,7	96,9	98,9	94,5	99,1	98,2
A/Shandong/02/2014 (H7N9)	97,8	98,0	98,0	98,1	97,5	95,5

3.3.2.3 Генетический анализ изолятов H9N2 генетической группы G1. В результате анализа нуклеотидной последовательности гена НА выделенного вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 было установлено родство с группой изолятов, выявленных на территории Израиля в 2007 году. Дальнейшая характеристика вирусов была основана на ранее выполненной работе по

структурированию вирусов H9N2, выделенных на территории Израиля [107]. Проведенный анализ показал, что вирусы A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2, A/chicken/Sverdlovsk/1436/2021 H9N2, A/chicken/Zabaikal/2137/2019 H9N2, A/chicken/Samara/429/2021 H9N2, A/chicken/Udmurtiya/2008/2021 H9N2, A/chicken/Penza/1890/2020 H9N2 составляют обособленную группу происходящую от вирусов, выявленных на территории Израиля в 2007 году. Ранее вирусы клады IV были причиной массовой эпизоотии на территории Израиля, Иордании и Ливана в период с 2006 по 2012 год. Вирус A/chicken/Israel/215/2007 взяли в качестве основного вируса для сравнения как наиболее охарактеризованный ранее и использовавшийся в качестве вакцинного штамма [107].

Выполненный анализ по результатам полногеномного секвенирования подтверждает происхождение вирусов выявленных на птицефабриках в РФ от вакцинного штамма A/chicken/Israel/215/2007. Результаты, полученные при анализе генов HA, NA, MP и NP для вирусов, выявленных в ходе длительной эпизоотии в Египте, указывают на то, что эпизоотия также идет от вирусов выявленных в Израиле в 2007 году (рисунок 8-10).

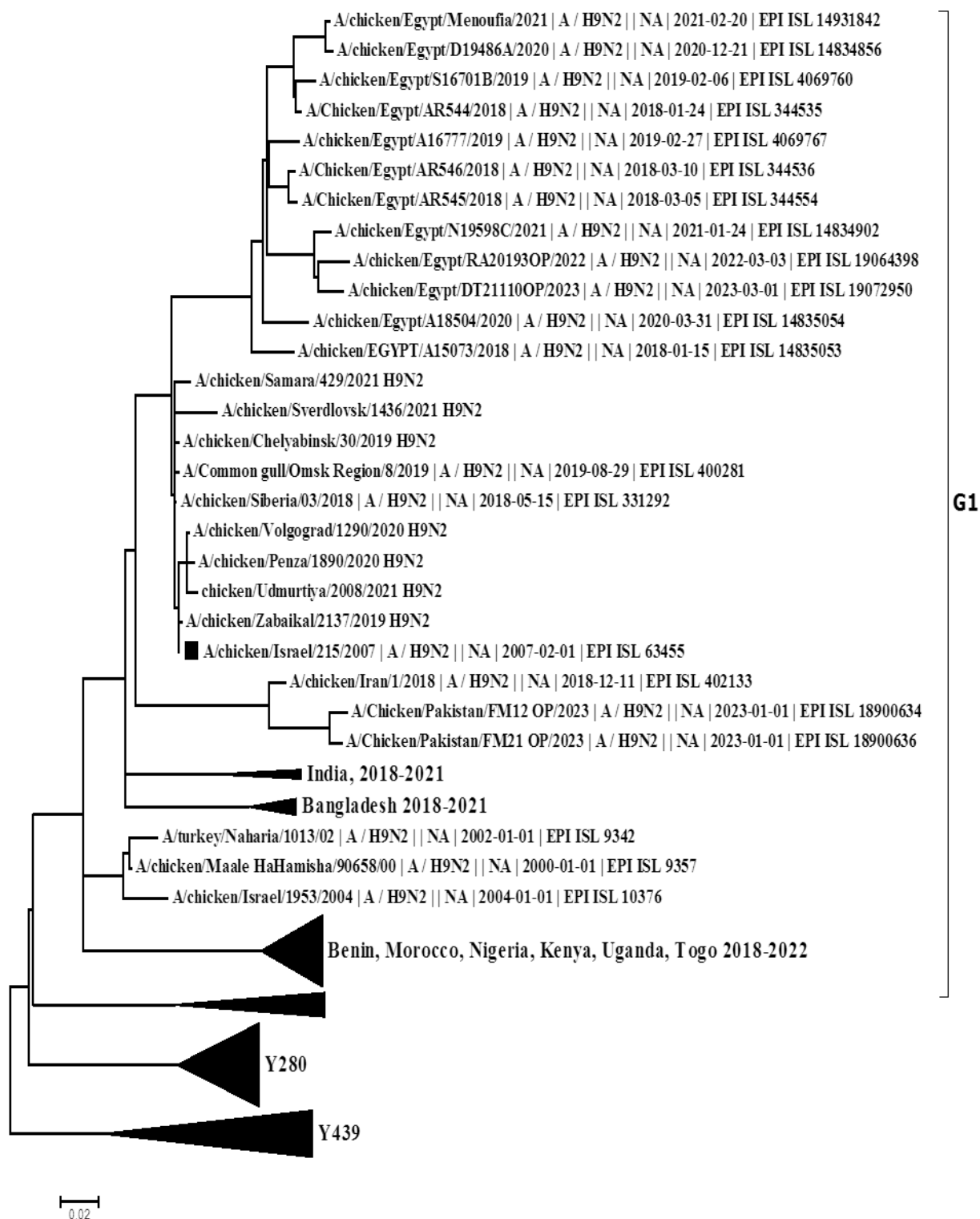


Рисунок 8 - Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена NA (1-1410 п.н. ОРС) вируса H9N2

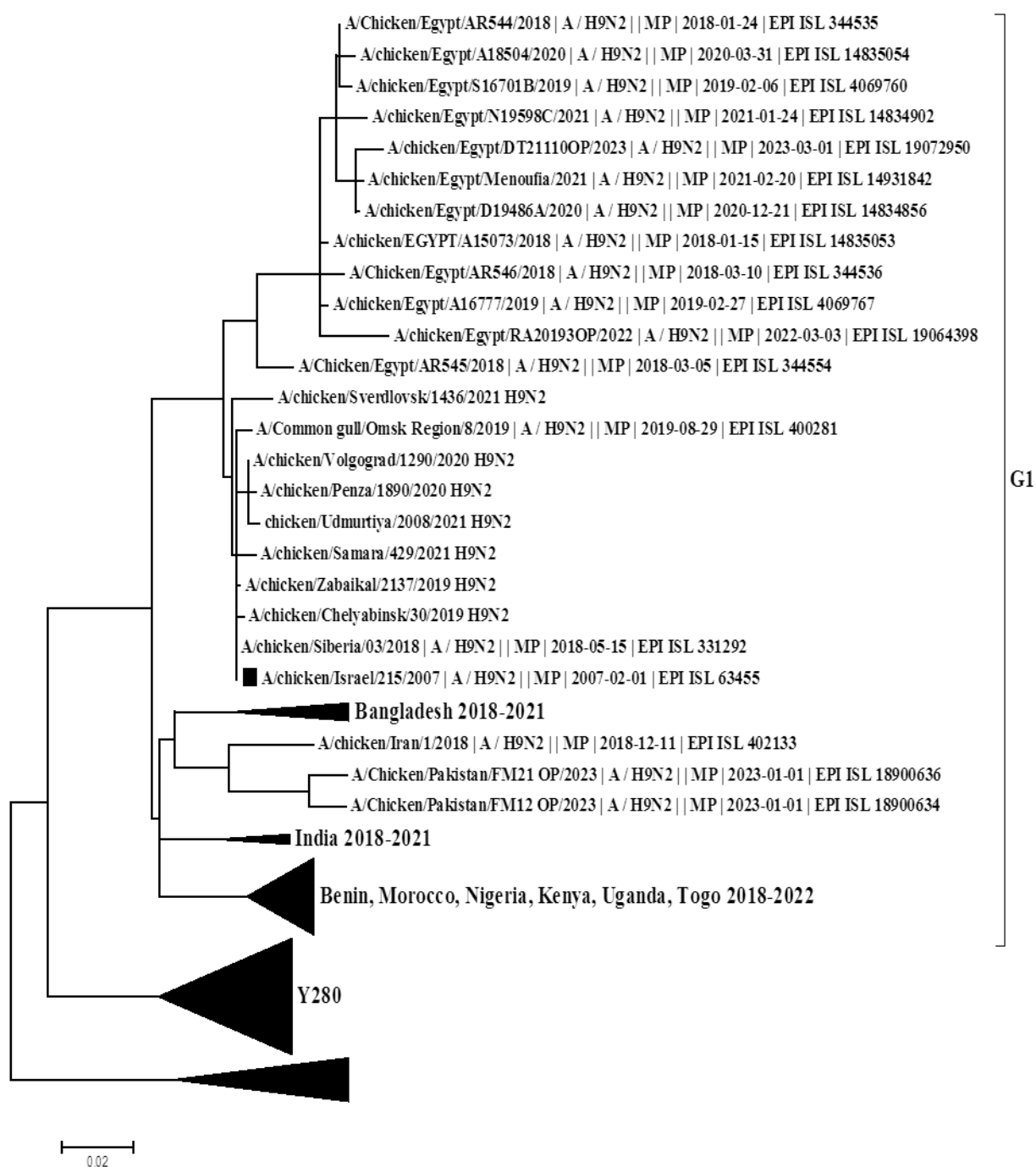


Рисунок 9 - Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена МР (1-977 п.н. ОРС) вируса H9N2

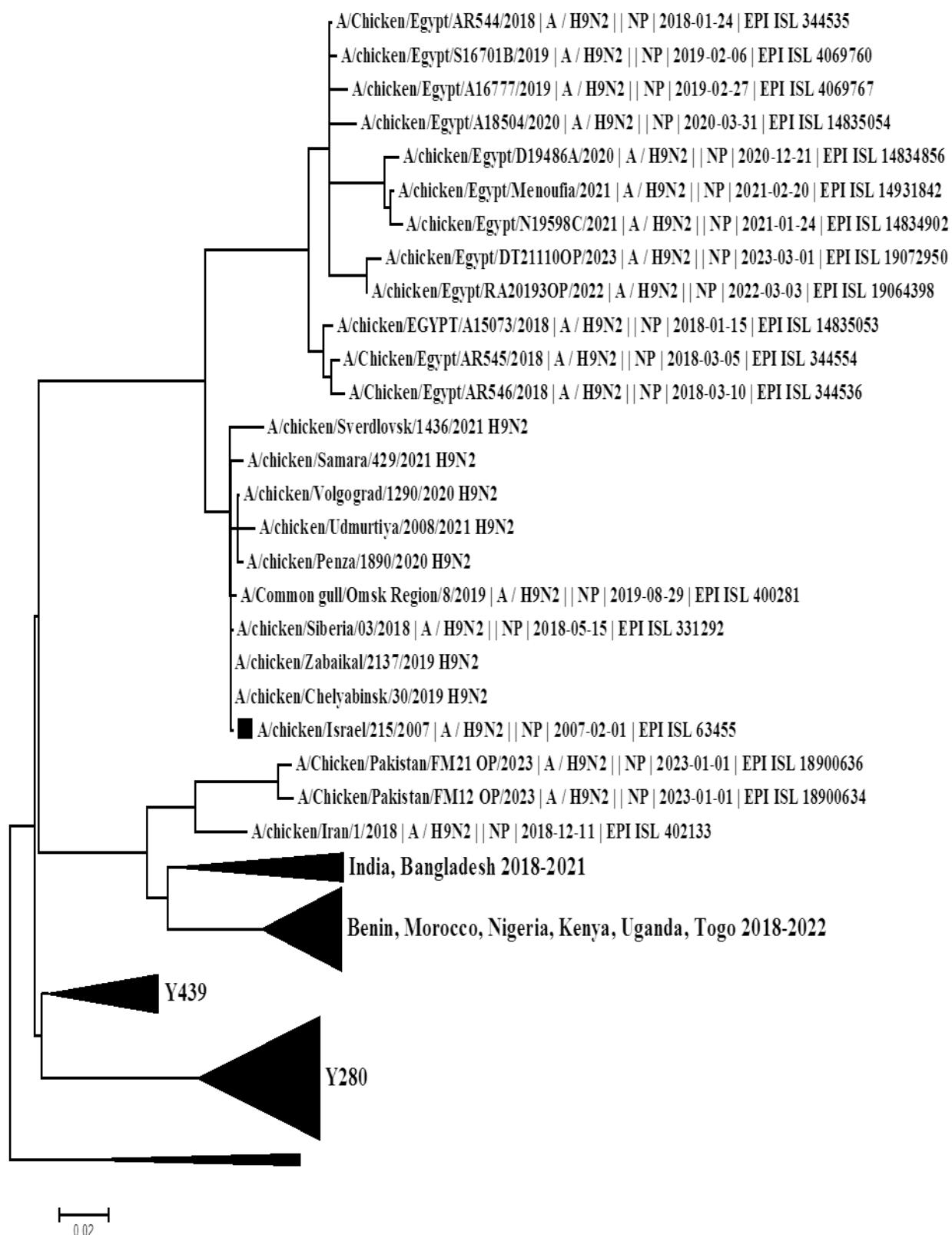


Рисунок 10 - Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена NP (1-1497 п.н. ORF) вируса H9N2

Высокий уровень генетического сходства по всем сегментам генома у изолятов A/chicken/Siberia/03/2018, A/chicken/Amur_Russia/17/2018, A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 указывает на отсутствие реассортации с вирусами гриппа других подтипов, ранее обнаруженных на территории РФ. Это обусловлено скорее всего тем, что птицеводческие хозяйства РФ как правило изолированы от внешней среды и являются предприятиями закрытого типа. В тоже время на территории Египта преобладают предприятия открытого типа, на которых похожие вирусы подвергаются активной реассортации с другими вирусами, что подтверждали результаты анализа генов NS, PA, PB1 и PB2 (рисунок 11-14).

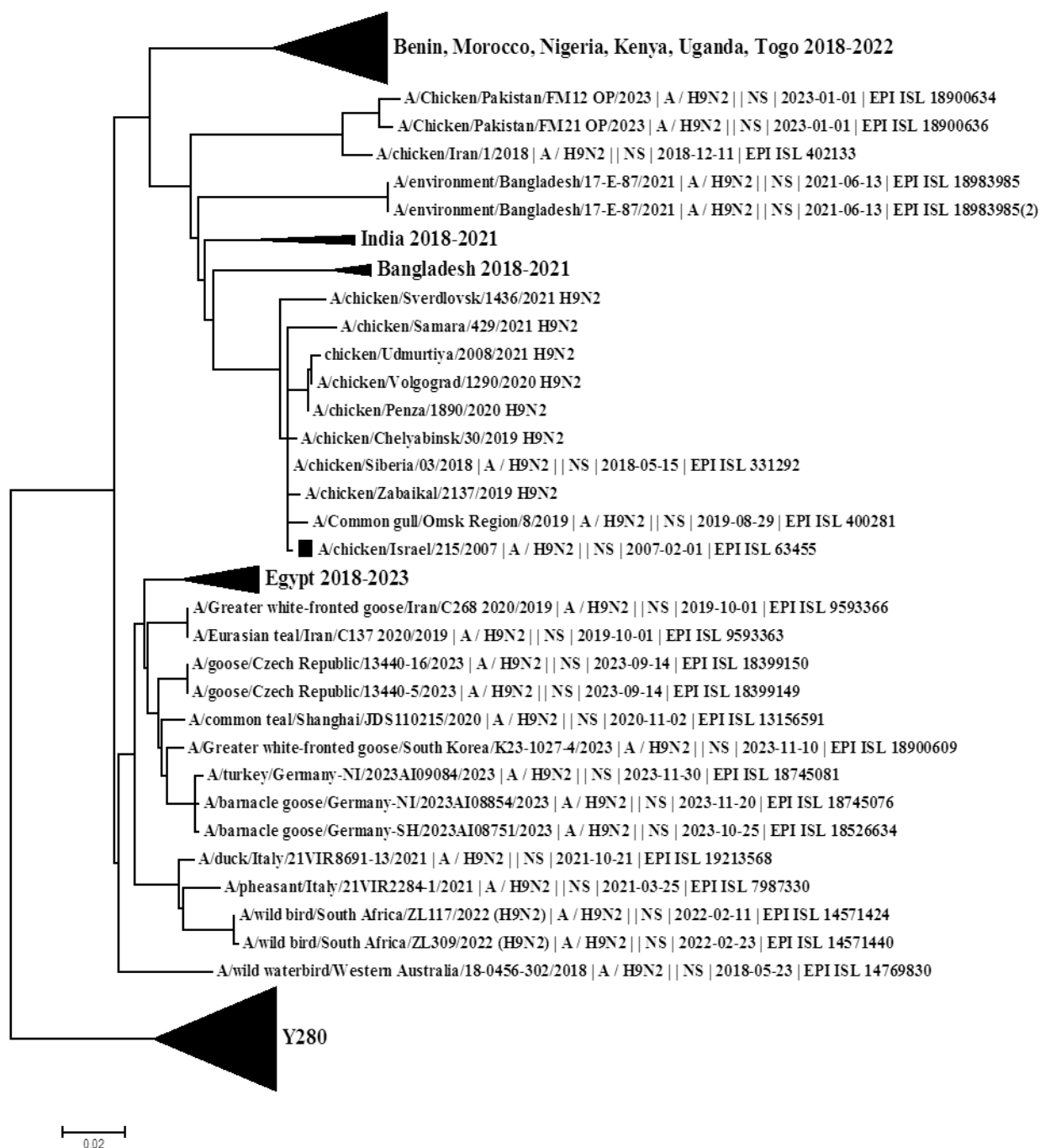


Рисунок 11 - Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена NS (1-838 п.н. ОРС) вируса H9N2

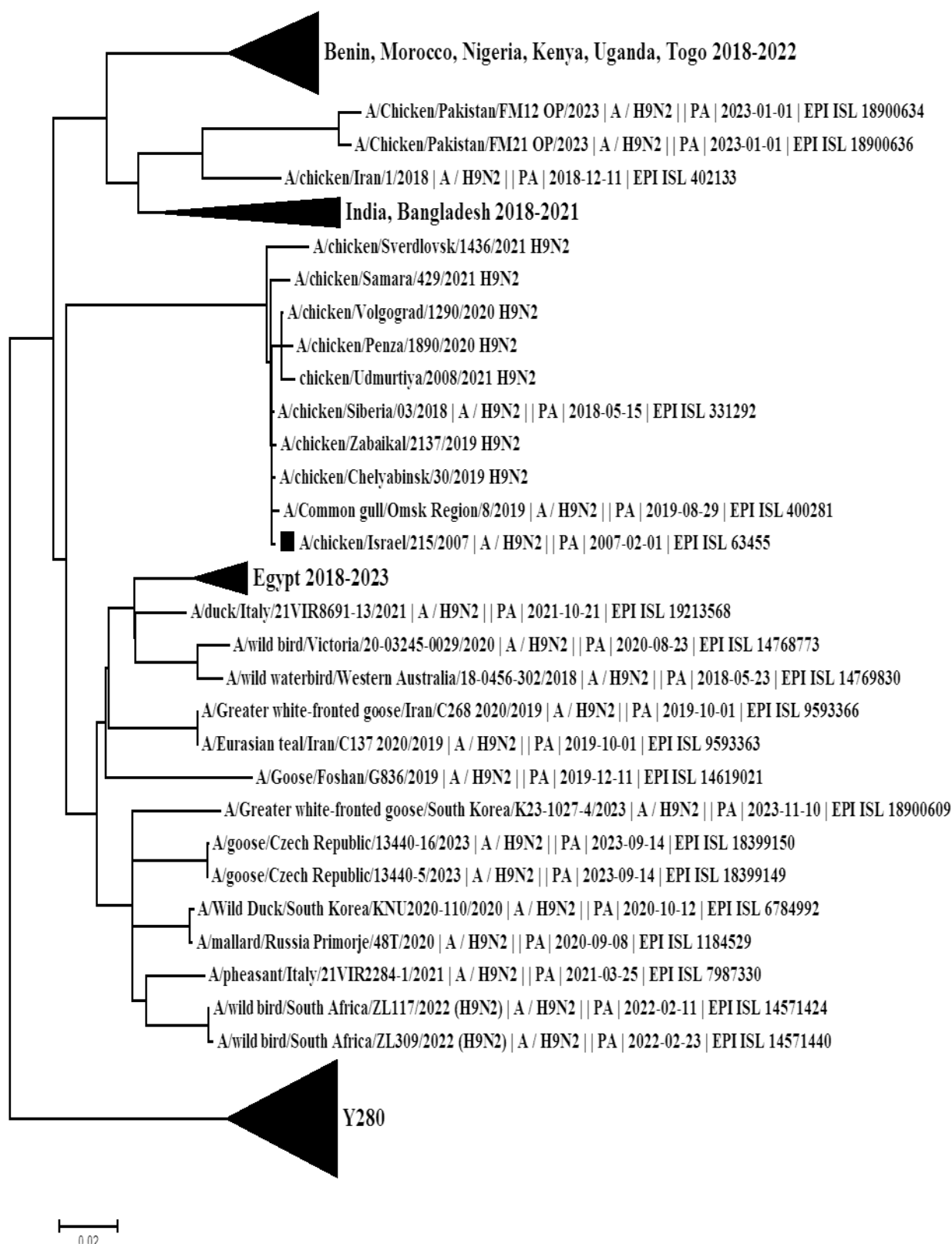


Рисунок 12 - Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена PA (1-2151 п.н. OPC) вируса H9N2

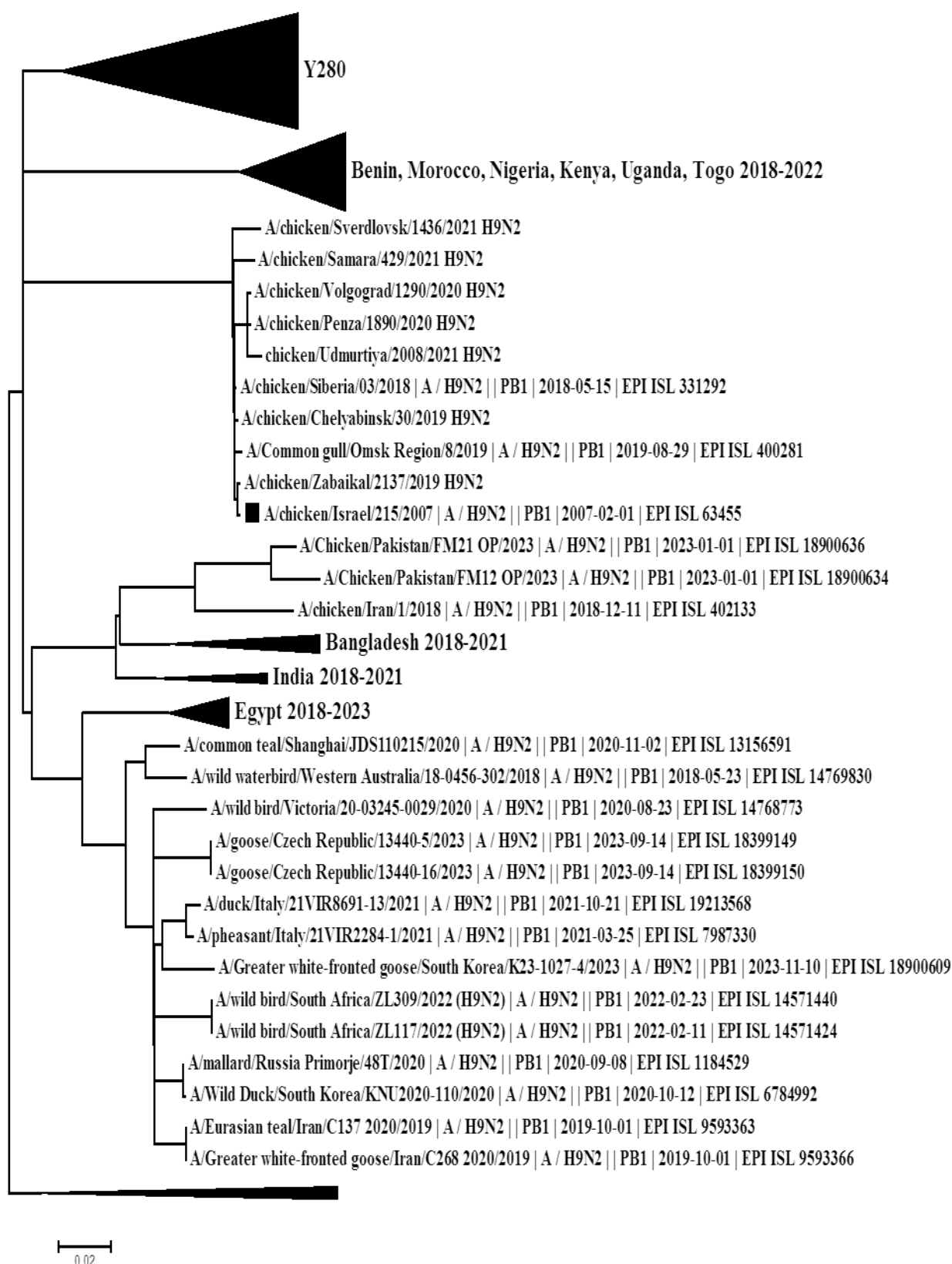


Рисунок 13 - Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена PB1 (1-2274 п.н. OPC) вируса H9N2

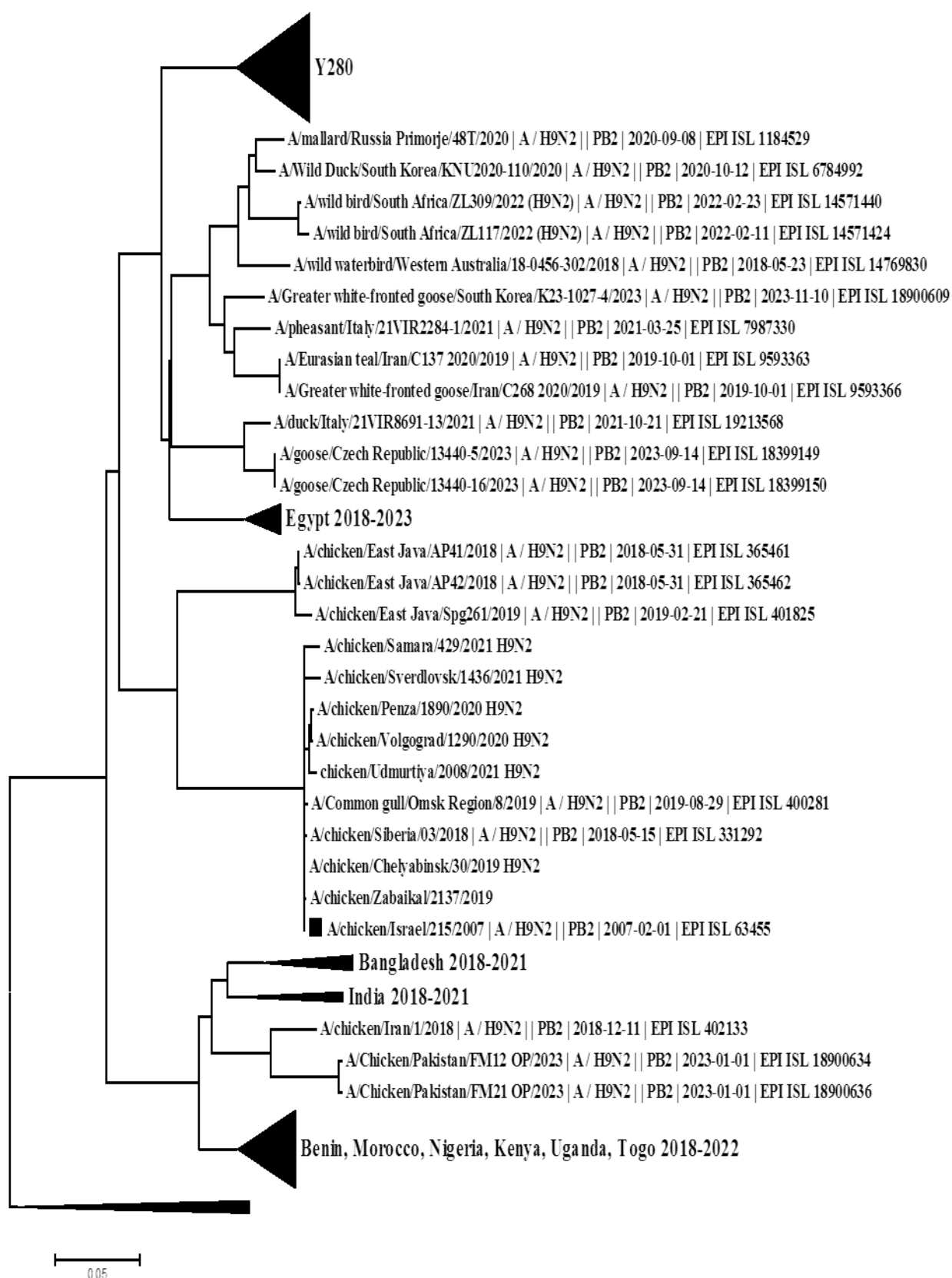


Рисунок 14 - Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамура-Ней, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена PB2 (1-2280 п.н. OPC) вируса H9N2

При этом стоит отметить, что вирусы генотипа G1 слабо реассортируют между собой. Среди вирусов выделенных на территории Африки, вирусы группы G1 сохраняют обособленность между различными регионами, что указывает на то, что для распространения вирусов данной группы ключевое значение имеют антропогенные факторы. Однако, занос вируса на территорию РФ произошел в период миграции перелетных птиц из регионов, где проводят вакцинацию домашней птицы и существует риск контакта с дикой птицей. В пользу гипотезы о заносе вируса генетической группы G1 на территорию РФ с дикой птицей указывает ряд фактов. Первый факт, что вирус был выявлен на значительной географической удаленности друг от друга A/chicken/Siberia/03/2018 (Новосибирская область), A/chicken/Amur_Russia/17/2018 (Амурская область), A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 (Челябинская область), A/chicken/Zabaikal/2137/2019. Второй факт, что в этот же период времени (2019-2020) на территорию РФ также массово был занесен вирус болезни Ньюкасла генотипа VII.1.1, характерного для стран Ближнего Востока [28]. К сожалению, установить источник заноса вирусов H9N2 генетической группы G1 крайне затруднительно в связи с низкой патогенностью для дикой и домашней птицы, когда возможно длительное бессимптомное носительство.

В результате анализа нуклеотидной последовательности гена НА выделенного вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 было установлено родство с группой изолятов, выявленных ранее на территории Израиля в 2007 году. Для филогенетического анализа был использован фрагмент нуклеотидной последовательности гена гемагглютиниона (1-1539 п.н. открытой рамки считывания (ОРС)). В результате анализа было установлено, что выделенный вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 относится к генетической группе G1 (рисунок 15).

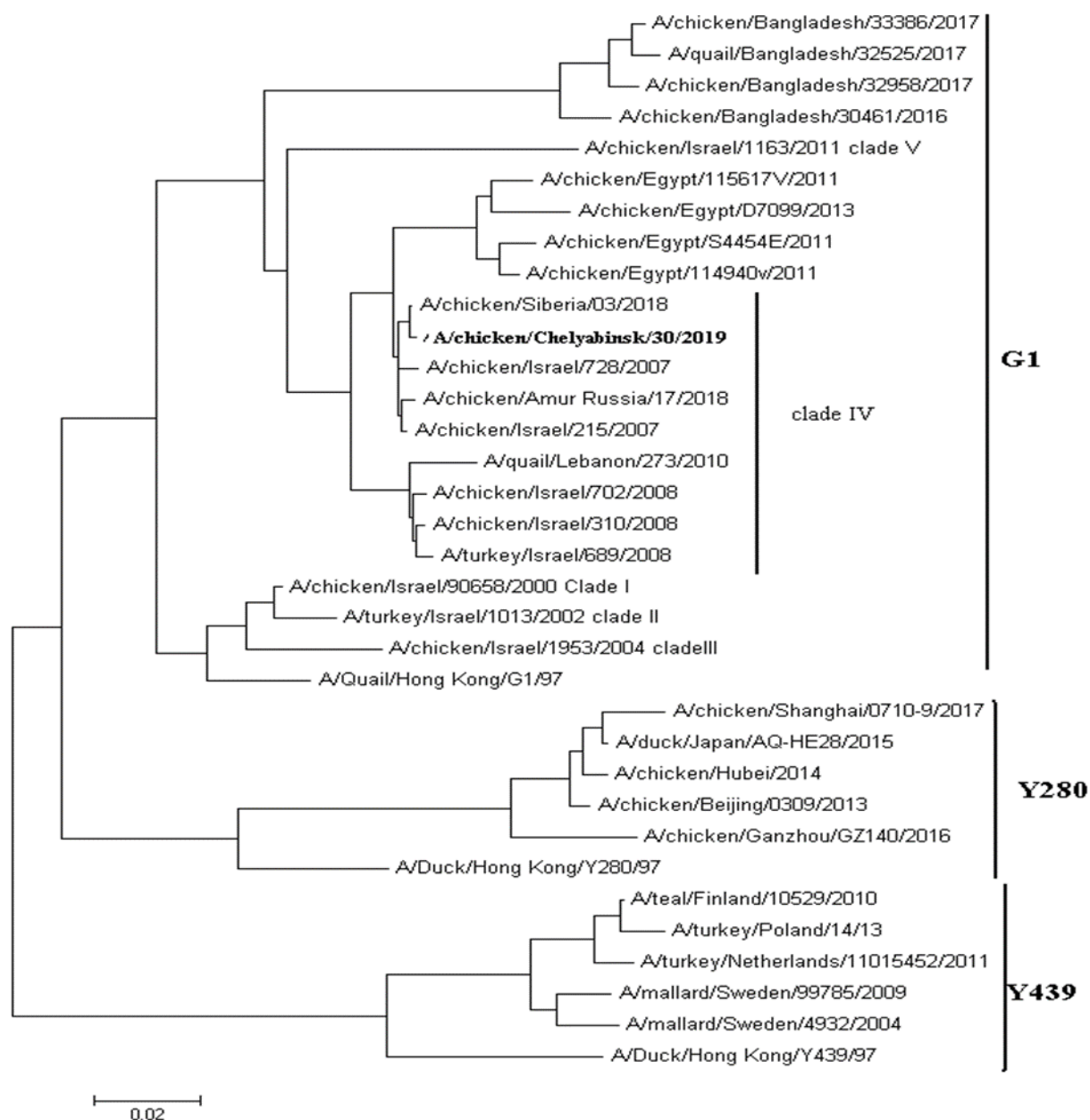


Рисунок 15 - Филогенетическое дерево, построенная методом NJ, по нуклеотидной последовательности фрагмента гена HA (1-1539 п.н. ОРС) вируса H9N2

Дальнейшая характеристика вируса была основана на ранее выполненной работе по структурированию вирусов H9N2, выделенных на территории Израиля [76]. Проведенный анализ показал, что вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 входит в обширную группу, основу которой составляют изоляты вируса H9N2 клада IV. В данный клад вошли вирусы, выделенные на территории Израиля, Иордании и Ливана в период с 2006г. по 2012г. [107]. Вирус

A/chicken/Israel/215/2007 был взят в качестве основного вируса для сравнения как наиболее охарактеризованный ранее и использовавшийся в качестве вакцинного штамма [76].

Для сравнительного анализа были использованы доступные нуклеотидные последовательности, содержавшие ОРС, ближайших его соседей по филогенетическому древу, выделенных в Израиле (A/chicken/Israel/215/2007), России (A/chicken/Siberia/03/2018, A/chicken/Amur_Russia/17/2018), Египте (A/chicken/Egypt/D7099/2013), Ливане (A/quail/Lebanon/273/2010). Было установлено, что выделенный вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 имеет очень высокий уровень генетической идентичности по всем генам с изолятом A/chicken/Israel/215/2007 H9N2 (таблица 5).

Таблица 5 - Уровень генетической идентичности изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 по разным генам

Изолят H9N2	Сравниваемый ген, %							
	HA	NA	PB1	PB2	M	NP	PA	NS
A/chicken/Israel/215/2007	99,4	99,4	99,6	99,9	99,6	99,9	99,8	99,6
A/chicken/Siberia/03/2018	99,8	99,7	99,8	99,8	99,6	99,9	99,8	99,7
A/chicken/Amur_Russia/17/2018	99,3	99,5	99,7	99,7	99,6	99,7	99,8	99,5
A/chicken/Egypt/D7099/2013	96,2	95,6	96,2	93,6	98,4	95,6	94,5	96,2
A/quail/Lebanon/273/2010	96,5	97,8	90,9	88,2	91,4	90,5	92,1	83,0

Высокий уровень генетического сходства по всем сегментам генома у изолятов A/chicken/Siberia/03/2018, A/chicken/Amur_Russia/17/2018, A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 указывает на отсутствие реассортации с вирусами гриппа других подтипов, ранее обнаруженных на территории РФ.

Проведенный анализ аминокислотной последовательности белка гемагглютиниона изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 показал наличие аминокислот G₂₂₅LIG₂₂₈ (по нумерации H3 подтипа) в рецептор связывающей части вирусного протеина. Для аминокислотной композиции G₂₂₅LIG₂₂₈ предполагается сродство к рецепторам птиц ACA2-3Gal и отсутствие взаимодействия с рецепторами млекопитающих группы ACA2-6Gal [140]. Таким образом, преимущественными носителями вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 должны быть птицы. Однако существуют работы, показывающие, что замена

Q226L способствует взаимодействию вируса гриппа с рецепторами клеток дыхательных путей человека [153].

Отдельно стоит отметить уже сформировавшуюся гетерогенность рецепторной части вирусного гемагглютиниона среди изолятов вируса гриппа птиц подтипа H9N2, выделенных на территории РФ. Анализ аминокислотной последовательности белка НА изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 выявил аминокислотные замены на участке рецептор связующего домена позиции 160, 181, 226, 227 (по нумерации H3) (рис.2).

Анализ предсказанной аминокислотной последовательности продемонстрировал высокое сходство (до 100%) вирусов A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 и ранее описанного A/chicken/Israel/215/2007 по остальным вирусным генам. Крайне малое число значимых нуклеотидных замен и отсутствие отличий по ключевым маркерам между вирусами A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 и A/chicken/Israel/215/2007 позволяют предположить о сходных биологических свойствах сравниваемых вирусов.

Выявленное высокое генетическое сходство вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 с ранее выявленными A/chicken/Siberia/03/2018 и A/chicken/Amur_Russia/17/2018 позволяет предположить, что занос вируса на территорию РФ произошел из небольшого географического ареала. Для сравнения можно просмотреть доступную информацию по изолятам вируса гриппа подтипа H9N2, выделенных на территории Народной Республики Бангладеш [70].

Согласно приведенным данным, генетическая гетерогенность среди вирусов группы G1 на территории Бангладеша значительно больше. Так, по гену НА различие между изолятами 2016 и 2017 года достигает 3%. В пользу единственного источника заноса вируса генетической группы G1 на территорию РФ также указывает географическая удаленность очагов выявления вирусов A/chicken/Siberia/03/2018 (Новосибирская область), A/chicken/Amur_Russia/17/2018 (Амурская область), A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 (Челябинская область). К сожалению, установить источник заноса крайне

затруднительно в связи с низкой патогенностью вирусов подтипа H9N2 для дикой и домашней птицы, когда возможно длительное бессимптомное носительство.

3.3.2.4 Анализ маркеров адаптации к репликации в организме млекопитающих и маркеров патогенности вируса гриппа птиц подтипа H9. Проведенный анализ аминокислотной последовательности белка гемагглютинина изолята A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 H9N2 показал наличие аминокислот G225LMG228 (по нумерации H3 подтипа) в рецептор-связывающей части вирусного протеина. Для аминокислотной композиции G225LMG228 предполагается сродство к рецепторам птиц ACA 2-3Gal и отсутствие взаимодействия с рецепторами млекопитающих группы ACA2-6Gal [21]. Таким образом, преимущественными носителями вируса A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 должны быть птицы. В тоже время в ряде работ показано, что замена Q226L способствует взаимодействию вируса гриппа с рецепторами клеток дыхательных путей человека [29]. Стоит также отметить наличие аминокислоты метионина в позиции 227 гемагглютинина (по нумерации H3 подтипа). Несмотря на то, что на данный момент функциональные возможности данной замены не известны, наблюдается её закрепление в популяции вируса гриппа с момента первого появления в 2011 году [134].

Анализ предсказанной аминокислотной последовательности репликативных протеинов (белки PB1, PB2, PA) не выявил у изолята A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 маркеров адаптации к репликации в организме млекопитающих (позиции 590, 591, 627, 701 в белке PB2, позиция 99 в белке PB1, позиции 356, 382, 409 в белке PA). Единственными заменами, указывающими на возможность размножения в организме млекопитающих, были замены 89V в белке PB2, 13P и 368V в белке PB1 [118, 122, 134]. Однако были выявлены мутации 30D, 215A в белке M1 и 42S в белке NS1, которые считают маркерами вирулентности вируса для мышей [107]. Анализ предсказанной аминокислотной последовательности вирусной нейраминидазы и белка M2 не выявил мутаций, ответственных за устойчивость к озельтамивиру (позиции 274, 292, 294 NA) и производным адамантана (позиция 31 белка M2) [24, 78, 85].

Несмотря на то, что изученный вирус A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 и вирусы, выделенные в 2018 г. на Дальнем Востоке, не содержат опасных мутаций (изменение сайта нарезания, изменение тропных и репликативных свойств вируса в сторону млекопитающих) ситуация внушает обеспокоенность из-за способности вируса гриппа подтипа Н9 к быстрым изменениям в результате реассортации с вирулентным подтипом Н7. Высокое генетическое сходство вирусов A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 и A/chicken/Primorsk/419/2018 ставит вопрос о возможности распространения вирусов группы Y280 через территорию Сибири. В Приморском крае вирус был выделен весной 2018 г., а в Республике Таджикистан он был обнаружен осенью 2018 г. Возможно, географическое распространение вируса связано с осенней миграцией птиц из Сибири. В таком случае вирусы генетической группы Y280 могут быть наиболее широко распространены, чем мы предполагаем. Учитывая имеющуюся информацию о выделении вируса гриппа птиц подтипа Н7 у людей на территории Китая, а также выявления антител среди населения Китая к подтипу Н9, необходимо тщательно изучать случаи заноса вируса подтипа Н9 на новые территории.

3.3.2.5 Возможность использования результатов полногеномного секвенирования для определения генезиса выявляемых вирусов. Результаты выполненного сравнительного и филогенетического анализа указывают на активно протекающие эволюционные процессы среди вирусов гриппа и необходимость актуализации производственных штаммов для производства эффективных средств специфической профилактики и диагностикумов для раннего выявления вирусоносительства. Поскольку определение эффективности специфической профилактики в отношении низкопатогенного гриппа птиц затруднительно, был проведен сравнительный анализ вируса A/chicken/Primorsk/419/2018 относительно общего генезиса Y280. Были использованы ранее изученные и охарактеризованные представители Y280 A/chicken/Zhejiang/HJ/2007, A/chicken/Rizhao/249/2013, A/environment/Zhongshan/ZS 201603/2016 [93, 137]. В качестве цифрового критерия для отображения эволюционного направления развития Y280 и отдельных вирусов внутри него, использовали изменение размаха вариации (R) нуклеотидной

идентичности - абсолютную разницу между максимальным и минимальным уровнем нуклеотидной идентичности при попарном сравнении вирусов. Данный критерий был выбран, исходя из принятых закономерностей общего эволюционного развития вирусов и вирусов гриппа в частности, и основан на разнице в скорости накопления нуклеотидных замен консервативных генов, кодирующих ферментативный аппарат, и генов, кодирующих поверхностные протеины. Гены, кодирующие внутренние белки, менее подвержены естественному отбору и попадают под пресс естественного отбора зачастую лишь при смене хозяина и в эволюции вируса гриппа процесс генетической реассортации генов «домашнего хозяйства» имеет гораздо большее значение нежели накопительная изменчивость. Так, если сравнить внутренние гены вирусов H9N2, использованных в работе (A/chicken/Primorsk/419/2018, A/chicken/Amursky/03/12, A/chicken/Tadjikistan/2379/2018), с вирусом H7N9 A/chicken/Xinjiang/SD036/2014 можно отметить очень похожие результаты попарного сравнения по генам PB1, PB2, M, NP, PA, NS (таблицы 6-8).

Таблица 6 - Уровень генетической идентичности изолята A/chicken/Primorsk/419/2018 по разным генам.

Изолят H9N2, использованный для сравнения	Сравниваемый ген, %							
	HA	NA	PB1	PB2	M	NP	PA	NS
A/chicken/Amursky/03/12	94,1	91,4	96,3	95,6	97,7	95,1	96,0	95,4
A/chicken/Tadjikistan/ 2379/2018	97,7	96,6	99,1	99,2	99,6	99,1	96,9	99,5
A/chicken/Zhejiang/HJ/2007	91,5	92,6	95,6	94,9	96,0	96,0	94,3	97,0
A/chicken/Rizhao/249/2013	95,1	92,6	95,6	95,4	98,0	97,6	95,3	95,9
A/environment/Zhongshan/ZS2016 03/2016	96,7	94,2	95,2	97,0	97,6	97,4	97,3	94,2
A/Beijing/1/2017 (H9N2)	96,0	95,4	97,8	97,1	99,7	94,7	97,3	99,3
A/chicken/Shanghai/0710-9/2017	98,2	96,2	98,7	96,5	99,1	94,1	97,0	97,6
A/duck/Japan/AQ-HE28/2015	98,7	97,3	96,3	94,5	99,4	94,7	97,7	98,1
A/chicken/Ganzhou/GZ86/2016	98,4	94,2	97,2	97,8	98,3	97,4	98,2	98,6
A/chicken/Ganzhou/GZ140/2016	94,8	97,2	94,9	97,2	98,8	98,1	98,3	99,0
A/chicken/Xinjiang/SD036/2014 (H7N9)	-	-	97,8	94,8	98,9	94,7	96,3	95,0

Для вируса A/chicken/Amursky/03/12 размах вариации составил 2,6 относительно вируса A/chicken/Zhejiang/HJ/2007 (94,8-97,4%), 2,3 относительно

вируса A/chicken/Rizhao/249/2013 (96,9-99,2%) и 3,7 относительно вируса A/environment/Zhongshan/ZS201603/2016 (94,3-98,0%).

Таблица 7 - Уровень генетической идентичности изолята A/chicken/Amursky/03/12 по разным генам

Изолят H9N2, использованный для сравнения	Сравниваемый ген, %							
	HA	NA	PB1	PB2	M	NP	PA	NS
A/chicken/Primorsk/419/2018	94,1	91,4	96,3	95,6	97,7	95,1	96,0	95,4
A/chicken/Tadzikistan/ 2379/2018	93,4	91,7	96,4	95,7	97,8	95,0	96,9	95,2
A/chicken/Zhejiang/HJ/2007	94,8	97,3	97,2	96,0	96,8	97,4	95,2	96,3
A/chicken/Rizhao/249/2013	96,9	94,5	97,2	98,1	98,4	95,9	96,6	99,2
A/environment/Zhongshan/ZS2016 03/2016	94,3	92,4	97,6	96,2	98,0	94,6	96,0	96,8
A/Beijing/1/2017 (H9N2)	94,6	92,0	97,4	96,4	97,9	95,7	96,0	95,3
A/chicken/Shanghai/0710-9/2017	94,0	91,7	97,0	96,5	97,5	97,0	95,9	94,6
A/duck/Japan/AQ-HE28/2015	94,9	93,0	96,8	95,8	98,2	97,6	96,2	94,6
A/chicken/Ganzhou/GZ86/2016	95,0	92,8	97,0	96,8	97,5	95,1	96,4	95,3
A/chicken/Ganzhou/GZ140/2016	95,3	92,1	95,9	96,2	98,0	95,1	96,6	95,7
A/chicken/Xinjiang/SD036/2014 (H7N9)	-	-	97,5	96,1	98,1	97,4	96,5	97,9

Таблица 8 - Уровень генетической идентичности изолята A/chicken/Tadzikistan/2379/2018 по разным генам.

Изолят H9N2, использованный для сравнения	Сравниваемый ген							
	HA	NA	PB1	PB2	M	NP	PA	NS
A/chicken/Primorsk/419/2018	97,7	96,6	99,1	99,2	99,6	94,7	96,9	99,5
A/chicken/Amursky/03/12	93,4	91,7	96,4	95,	97,8	95,0	95,8	95,2
A/chicken/Zhejiang/HJ/2007	91,0	92,7	95,7	94,9	96,1	95,8	93,7	96,8
A/chicken/Rizhao/249/2013	94,3	92,6	95,7	95,5	98,1	97,4	95,1	95,7
A/environment/Zhongshan/ZS2016 03/2016	96,0	94,0	95,3	97,2	97,1	97,2	97,5	93,9
A/Beijing/1/2017 (H9N2)	95,0	95,0	97,9	97,3	99,8	94,7	97,7	99,3
A/chicken/Shanghai/0710-9/2017	97,3	96,1	98,7	96,5	99,2	94,1	96,7	97,6
A/duck/Japan/AQ-HE28/2015	97,9	97,2	96,4	94,6	99,5	94,7	98,3	97,9
A/chicken/Ganzhou/GZ86/2016	97,5	93,8	97,3	98,0	98,4	97,5	97,2	98,6
A/chicken/Ganzhou/GZ140/2016	93,9	97,2	95,1	97,4	98,9	97,9	97,7	99,0
A/chicken/Xinjiang/SD036/2014 (H7N9)	-	-	98,0	94,9	99,0	94,6	96,4	94,8

Для вируса A/chicken/Primorsk/419/2018 размах вариации составил 5,5 при сравнении с вирусом A/chicken/Zhejiang/HJ/2007 (91,5-97,0%), 2,9 с изолятом A/chicken/Rizhao/249/2013 (95,1-98,0%) и 0,9 с вирусом A/environment/Zhongshan/ZS201603/2016 (96,7-97,6%).

Для вируса A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 R составил 5,8 при сравнении с вирусом A/chicken/Zhejiang/HJ/2007 (91,0-96,8), 3,8 с изолятом A/chicken/Rizhao/249/2013 (94,3-98,1%) и 1,5 относительно вируса A/environment/Zhongshan/ZS201603/2016 (96,0-97,5%).

Сравнение размаха вариации нуклеотидной идентичности позволит определить стабильные изоляты, эволюционировавшие вместе с основной массой других вирусов своей генетической группы, и не имевших в своем развитии значительных генетических изменений, обусловленной реассортацией с вирусами других групп (таблица 9).

Таблица 9 – Размах вариации (R) нуклеотидной идентичности выбранных изолятов относительно представителей вирусов гриппа группы Y280.

Изоляты	A/chicken/ Amursky/03/12	A/chicken/ Primorsk/419/ 2018	A/chicken/Tadjikistan/ 2379/2018
A/chicken/Zhejiang/HJ/2007	2,6	5,5	5,8
A/chicken/Rizhao/249/2013	2,3	2,9	3,8
A/environment/ Zhongshan/ZS201603/2016	3,7	2,6	1,5

Изменение R в сторону уменьшения (при сравнении с вирусами Y280 на временном интервале 2007-2016 гг.) подтверждает актуальность вирусов A/chicken/Primorsk/419/2018 и A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 относительно вновь выделяемых вирусов внутри генетической группы Y280. Увеличение размаха вариации A/chicken/Amursky/03/12 относительно изолятов вируса гриппа на временном отрезке 2007-2016 указывает на непрекращающееся изменение группы Y280. Вирусы A/chicken/Primorsk/419/2018 и A/chicken/Tadjikistan/2379/2018 обладают самодостаточным набором генов, способны к успешному и устойчивому воспроизводству в различных лабораторных системах.

В результате филогенетического анализа, общего сравнительного анализа и сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей был выбран изолят A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2 для получения штамма для изготовления средств диагностики и специфической профилактики.

3.3.3 Определение вирулентных свойств вирусов H9N2

Оценку вирулентных свойств, выбранных в результате филогенетического анализа изолятов H9N2, проводили с помощью определения индекса патогенности при внутривенном заражении цыплят (IVPI). Формировали группу из десяти серонегативных к вирусу ГП, клинически здоровых цыплят на изолят. Отсутствие специфических антител подтверждали в ИФА. В течение эксперимента цыплятам был предоставлен свободный доступ к корму и воде. Результаты наблюдения клинического состояния птицы и полученные значения индексов патогенности представлены в таблице 10.

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

Таблица 10 - Оценка клинического состояния цыплят после заражения и полученные индексы IVPI

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

гемагглютини́на 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 [78, 154].

3.3.4 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 генетической линии 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. Цыплятам трех групп внутримышечно вводили вируссодержащую ЭЭЖ с инфекционной активностью 10^6 ЭИД₅₀/см³ в объеме 0,5 см³. Одна группа была контрольная. Доступ к корму и воде был свободным. За цыплятами установили ежесуточное наблюдение и регистрировали клиническое состояние. Клинически здоровыми считали цыплят охотно потребляющих корм и воду, без каких-либо признаков заболевания. Больными считали птиц, неохотно употребляющих корм и воду, с признаками угнетения, взъерошенным оперением, с нарушением деятельности дыхательной или пищеварительной систем.

На 4 – 8 сутки после заражения у нескольких цыплят из всех инфицированных групп наблюдали угнетенное состояние, взъерошенность оперения, отказ от корма и воды. Гибели зараженных птиц отмечено не было.

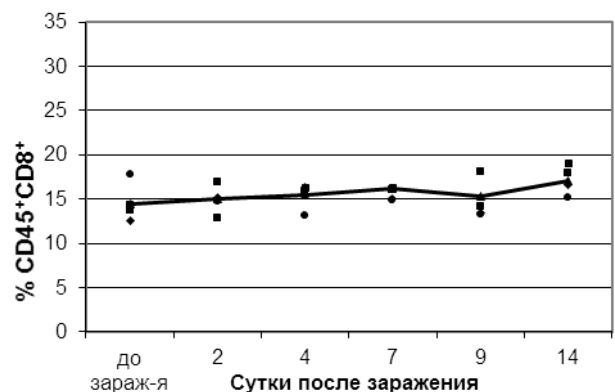
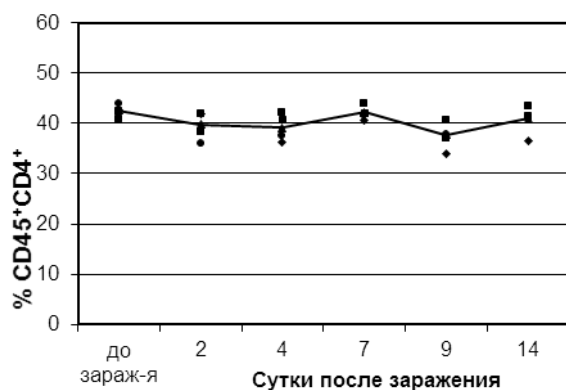
Исследование сывороток крови, полученных до заражения и через 14 суток после заражения, на наличие антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Динамику изменения количественного соотношения популяций Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+$, $CD45^+CD4^+$ и $CD45^+CD8^+$) и В-лимфоцитов ($CD45^+$, $CD45^+CD19^+$) в периферической крови цыплят изучали методом проточной цитофлуориметрии.

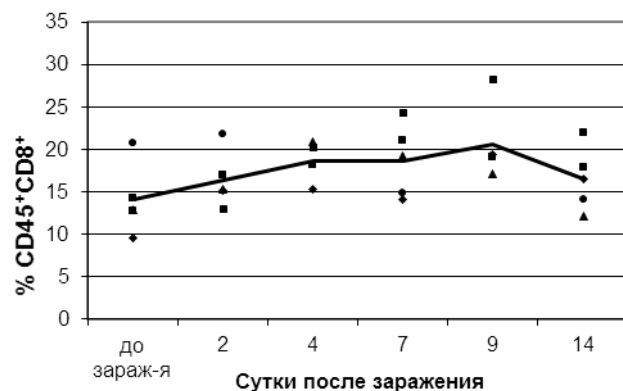
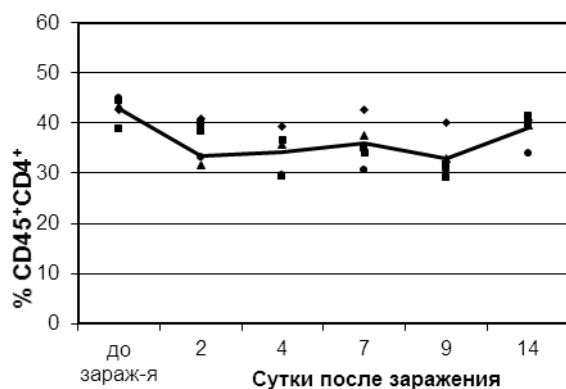
3.3.4.1 Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов. Для количественного анализа субпопуляций клеток лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии кровь у цыплят отбирали до заражения и на 2, 4, 7, 9 и 14 сутки после заражения в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА КЗ.

Через 2-4 суток после инфицирования регистрировали значительное снижение процента $CD45^+CD4^+$ Т-клеток (Т-хелперов) и увеличение процента $CD45^+CD8^+$ цитотоксических клеток в крови инфицированных птиц (рисунок 16). Относительное количество обеих популяций у инфицированных цыплят отличалось от первоначального уровня (до заражения) в 1,3-1,5 раза для Т-хелперов и в 1,3-1,9 раза для цитотоксических клеток. У цыплят контрольной группы в популяциях клеток Т-лимфоцитов существенных изменений не регистрировали.

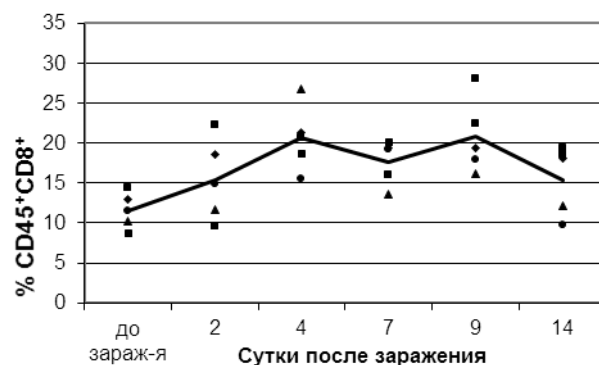
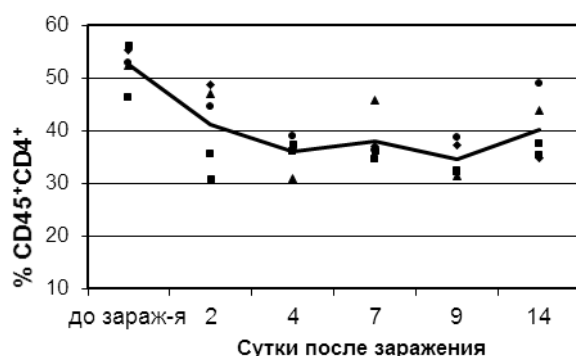
Через 9 суток после заражения наблюдали увеличение уровня Т-хелперов в крови. Нормализацию объёма обеих субпопуляций Т-лимфоцитов у заражённых цыплят регистрировали к 14 суткам после заражения, но не для всех исследованных особей.



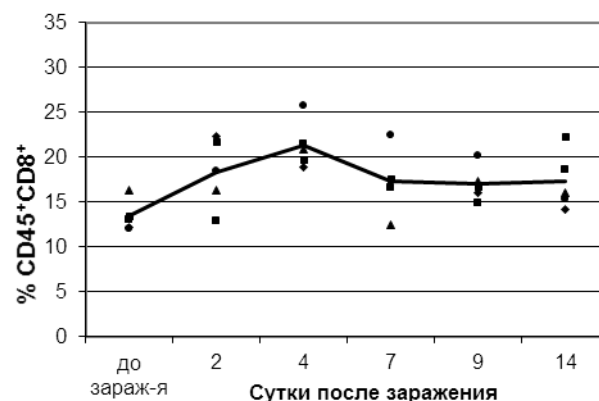
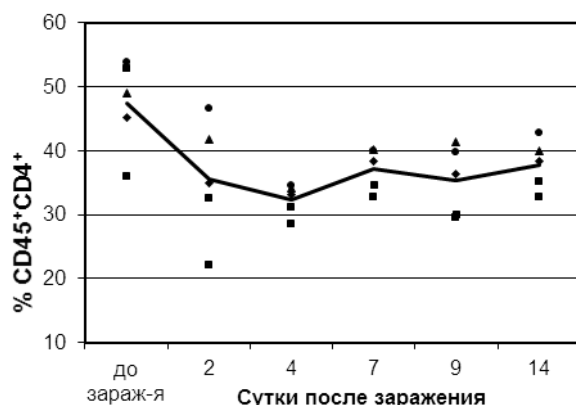
контроль



штамм A/chicken/Primorsk/419/2018



штамм A/chicken/Chelyabinsk/30/2019



штамм A/chicken/Tadjikistan/2379/2018

Рисунок 16 - Динамика уровня субпопуляций Т-лимфоцитов цыплят после заражения изолятами H9N2

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

Развитие инфекционного процесса оказывало иммуносупрессивное влияние на иммунную систему заражённых цыплят. Полученные результаты о снижении относительной концентрации Т-хелперов в периферической крови после инфекции

подтверждают данные исследователей Нао Х. и др. и Dai М. и др. [54, 63]. Значительное повышение процента цитотоксических ($CD8^+$) Т-клеток в крови цыплят, инфицированных вирусом гриппа А/Н9N2, было установлено также Dai М. и др. на 5-7 сутки после заражения [54, 124].

Анализ изменения отношения $CD4^+/CD8^+$ показал его снижение на 4 сутки после заражения у цыплят 1, 2 и 3 группы в 1,9; 2,6 и 2,3 раза, соответственно вследствие уменьшения относительного количества $CD4^+$ и увеличения объёма $CD8\alpha^+$ Т- лимфоцитов (рисунок 17). К 14 суткам после заражения показатель $CD4^+/CD8^+$ вновь увеличивался, но в среднем по группам его величина оставалась в 1,3-1,6 раза меньше первоначальных значений.

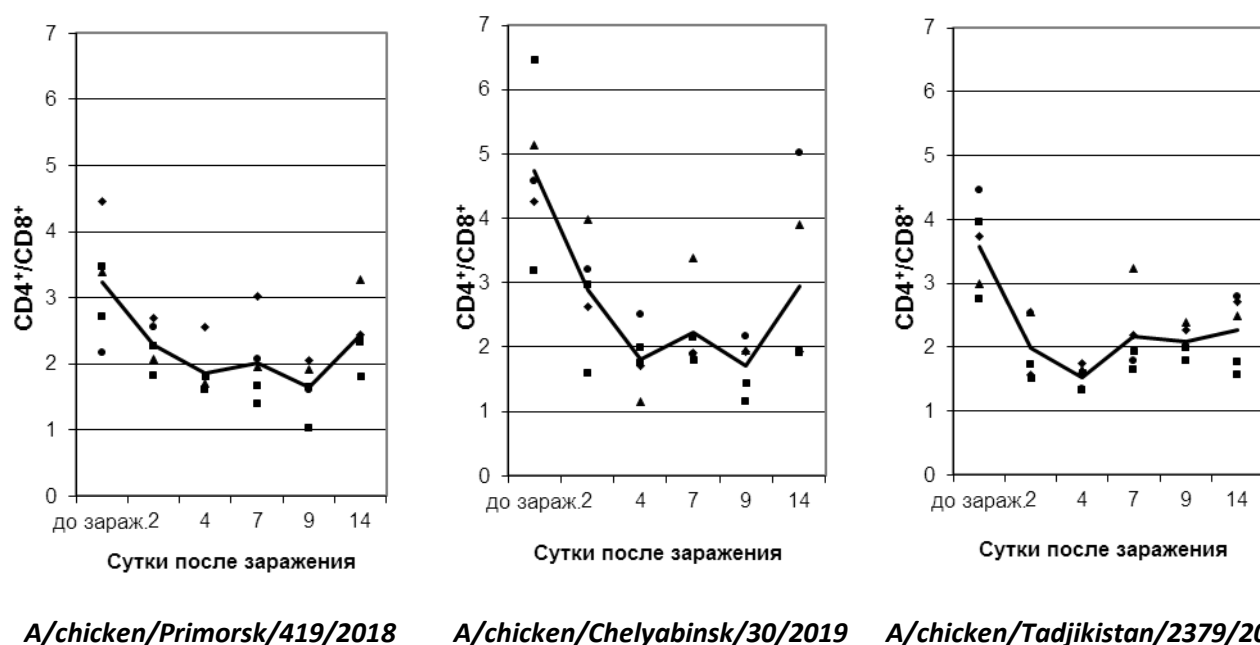


Рисунок 17 - Динамика отношения $CD4^+/CD8^+$ в лимфоцитах крови цыплят после заражения тремя изолятами вируса Н9N2

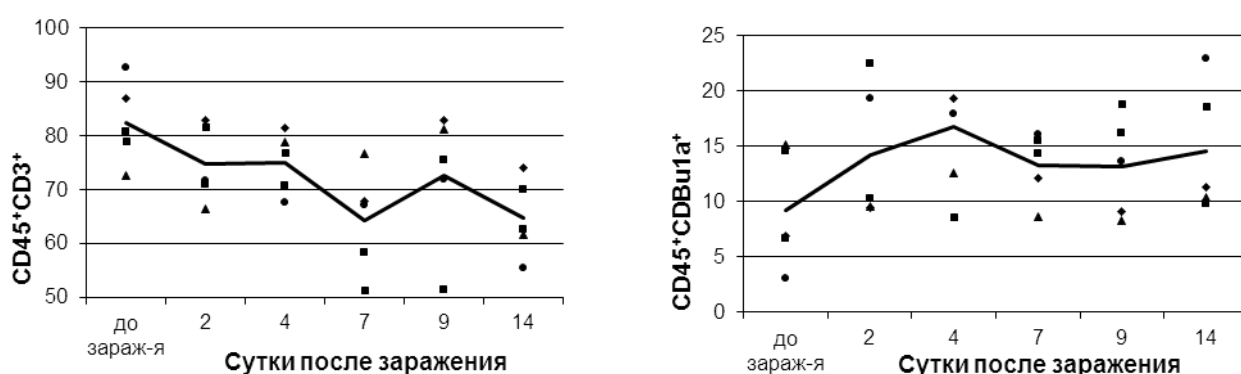
Примечание: сплошная линия представляет среднее арифметическое значение по группе из 5 цыплят. Отдельные символы представляют процентное количество клеток для каждой птицы из группы.

Yang Y. и др. и Dai М. и др. также показали, что вирусные инфекции вызывают иммунную супрессию, которая выражалась в том числе снижением отношения $CD4^+/CD8^+$ в Т-лимфоцитах крови [54, 128]. Иммунизация вакцинными препаратами, наоборот, приводила к активации иммунного ответа и обратной динамике в сторону увеличения отношения $CD4^+/CD8^+$ [54, 88].

Хуе М. и др. и Yang S. и др. считали, что увеличение отношения $CD4^+/CD8^+$ после иммунизации и снижение после инфицирования предполагало усиление иммунного ответа после вакцинирования и подавление иммунитета при вирусной инфекции. Иммунизация вакциной вызывала выраженный гуморальный иммунный и клеточный ответ $CD4^+$ Т-клеток [59, 148].

В исследованиях Fu L. и др. и Dai M. и др. было установлено, что вирусная инфекция в основном стимулировала $CD8^+$ Т-клеточный ответ, а иммунизация $CD4^+$ Т-клеточный ответ [43, 147]. Высокий уровень антител к вирусу H9N2 и повышение процента цитотоксических $CD8^+$ Т-клеток играют важную роль в противовирусной защите [124].

На рисунке 18 представлена динамика относительного количества Т и В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят. У контрольной группы существенных изменений относительного количества Т- и В-лимфоцитов не наблюдали. В трёх группах отмечали снижение относительного количества Т-лимфоцитов в среднем на 15-20%, что может свидетельствовать о недостаточности клеточного иммунитета. Увеличение относительного количества В-лимфоцитов на 5-10% в зависимости от группы регистрировали только к 14 суткам после инфицирования. Наряду с увеличением процента Т-хелперов это свидетельствовало об активации иммунного ответа у инфицированных птиц.



штамм A/chicken/Primorsk/419/2018

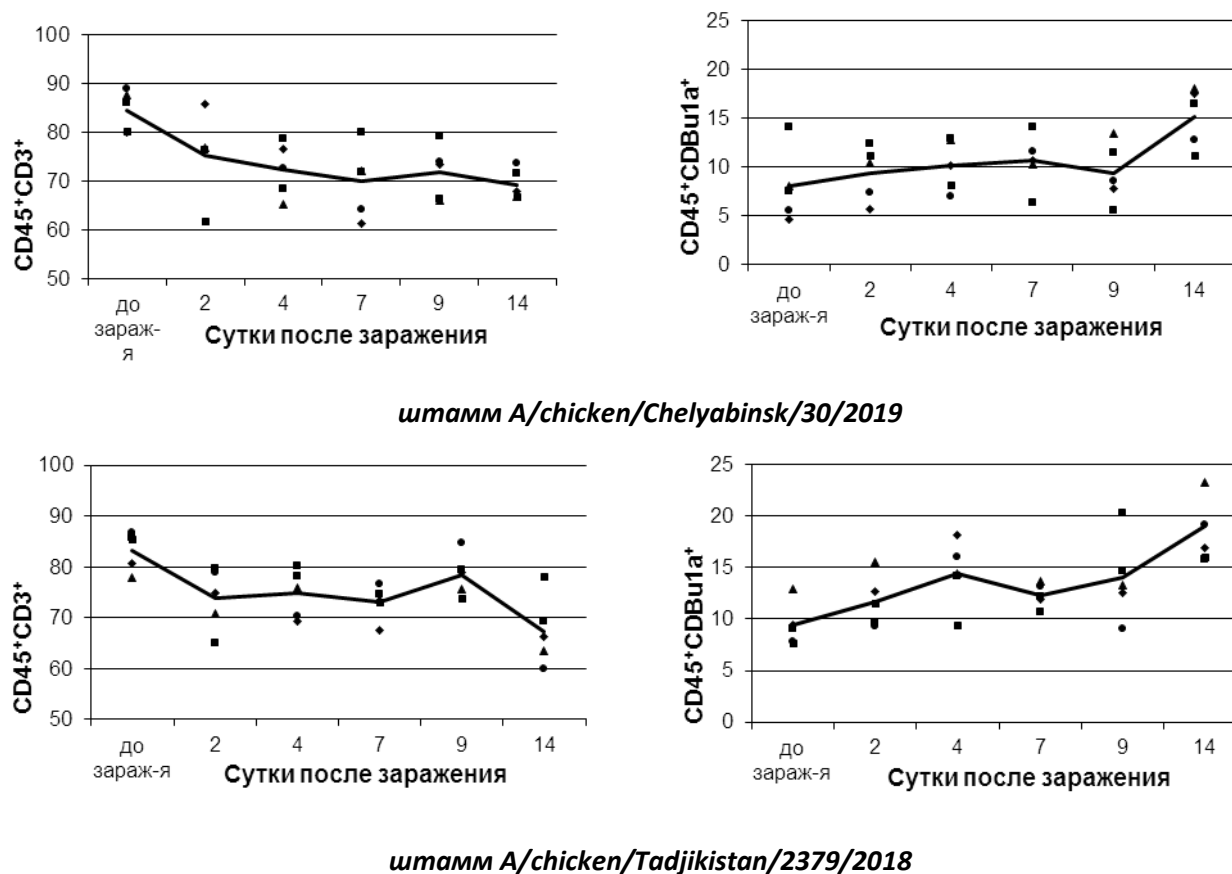


Рисунок 18 - Динамика уровня Т и В-лимфоцитов в периферической крови цыплят после заражения вирусами H9N2

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

Функция В-лимфоцитов, ответственных за гуморальный иммунитет, характеризуется преобразованием В-клеток в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины, которые имеют специфическую активность против внедрившегося антигена. При изучении динамики относительного количества В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят установлено увеличение относительного количества В-лимфоцитов в крови.

Dai M. и др. при сравнительном анализе ключевых факторов иммунной защиты цыплят, инфицированных вирусом A/H9N2, и СПФ-цыплят, иммунизированных инактивированной вакциной, пришли к выводу, что дефицит $CD8^+$ Т-клеток является ключевой причиной иммунодефицита и инфицирования поголовья в стадах вакцинированных птиц [54].

3.3.4.2 Серологические исследования. Сыворотки крови цыплят исследовали до и на 14 сутки после заражения в РТГА с антигеном, полученным из штамма A/chicken/Primorsk/419/2018. Результаты выявления специфических антител к вирусу гриппа птиц подтипа А/Н9 в РТГА представлены в таблице 11.

У цыплят инфицированных групп на 14 сутки после заражения среднее значение титра антител в РТГА было выше $6 \log_2$. 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 11 - Титр антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в РТГА

Изолят	До заражения	14 сут. после заражения	
	Всего проб/ положительных	Всего проб/ положительных	Средний титр антител ($\log_2$)
A/chicken/Tadjikistan/2379/2018	5/0	5/5	$8,7 \pm 0,3$
A/chicken/Primorsk/419/2018	5/0	5/5	$8,1 \pm 0,4$
A/chicken/Chelyabinsk/30/2019	5/0	5/5	$6,9 \pm 0,4$
Всего проб:	15/0	15/15	$7,9 \pm 0,3$

Таким образом, в опыте исследовали ключевые факторы иммунного ответа цыплят, инфицированных вирусами Н9Н2 из разных генетических линий. Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови цыплят, заражённых тремя изолятами вируса Н9Н2, показал наличие изменений, вызванных вирусной инфекцией – снижение относительного количества Т-лимфоцитов в крови, существенное изменение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в сторону уменьшения процента CD4+ клеток и увеличения процента CD8+ клеток и как следствие снижение отношения CD4+/CD8+. 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.

3.3.5 Определение антигенной активности изолятов Н9N2

В результате филогенетического анализа нами были выбраны изоляты для определения антигенных свойств вируса Н9N2 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).

Анализируя полученные данные, установлено, что выделенные вирусы способны к размножению в СПФ куриных эмбрионах без предварительной адаптации и обладают высокой гемагглютинирующей и инфекционной активностью.

Вирусосодержащие суспензии инаktivировали 0,1% раствором β -пропиолактона. Три последовательными пассажами в СПФ куриные эмбрионы осуществляли проверку полноты инаktivации вирусного материала. Полученные антигены очищали от балластных белков путём низкоскоростного центрифугирования и использовали для получения гипериммунной сыворотки крови кур и как антиген в РТГА.

Инаktivированными препаратами эмульгированные в масляном адъюванте Монтанид ИЗА-70 (Франция) в соотношении 30/70 иммунизировали 40-суточных цыплят яичного кросса. Препарат в дозе 10^6 ЭИД₅₀/см³ вводили внутримышечно в объёме/ 1,0 см³. В каждой группе было по 10 цыплят. Одна группа была контрольной. 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. Результаты представлены в таблице 12. После двукратной иммунизации титры антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 составили значения от $6,4 \pm 0,34 \log_2$ (A/chicken/Amursky/03/12) до $7,3 \pm 0,44 \log_2$ (A/chicken/Primorsk/419/2018).

Таблица 12 - Титр антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови иммунизированных кур в РТГА

Изоляты, используемые для иммунизации	Период после иммунизации/ Средний титр антител в РТГА, $\log_2$ (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 $\log_2$ » – отрицательный результат

Специфичность антигенов подтвердили в РТГА с моноспецифическими сыворотками к 16 подтипам вируса гриппа птиц по гемагглютнину (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve), Италия) и с сыворотками крови к другим гемагглютинирующим вирусам (НБ, МГ, МС, ССЯ-76) с использованием диагностических наборов производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Россия). В качестве отрицательного контроля использовали нормальную сыворотку крови кур (IZSve, Италия) (таблица 13).

Таблица 13 - Определение типовой специфичности по гемагглютнину испытуемых изолятов Н9N2 в РТГА

Сыворотки	Титр с гомологичным антигеном, $\log_2$ (n=3)		Результат реакции с испытуемым изолятом/ Средний титр антител, $\log_2$ (n=3)				
	Отрица- тельный контроль	Положи- тельный контроль	A/chicken /Primorsk /419/ 2018	A/chicken/ Amursky/0 3/12	A/chicken/Pr imorsk/ 3124/2018	A/chicken/ Tadjikistan/ 2379/ 2018	A/chicken/ Chelyabins k/30/2019
Н1-Н8, Н10-Н16	≤ 2,0	7,3±0,33	≤ 2,0	≤ 2,0	≤ 2,0	≤ 2,0	≤ 2,0
Н9N2	≤ 2,0	8,7±0,33	8,3±0,33	6,7±0,00	6,7±0,33	7,7±0,33	7,3±0,33
НБ, ССЯ- 76, МГ, МС	≤ 2,0	7,0±0,00	≤ 2,0	≤ 2,0	≤ 2,0	≤ 2,0	≤ 2,0

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

В результате проведенной работы 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 в РТГА, среднее значение титра антител составило $8,3 \pm 0,33 \log_2$.

3.3.6. Получение специфических компонентов для использования в наборе для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в реакции торможения гемагглютинации

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 был депонирован во Всероссийскую коллекцию экзотических штаммов вируса ящура и других микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ».

3.3.6.1 Получение антигена вируса гриппа птиц подтипа Н9. Инактивированный 0,1% раствором β -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». Результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Исследование специфичности препарата антигена вируса гриппа птиц подтипа Н9

№	Референтная сыворотка:	Титр антител к вирусу ГП подтипа Н9 в РТГА, $\log_2$ (n=3)
1	Вируса гриппа птиц подтипа Н9 (IZSVe, Италия)	$8,0 \pm 0,00$
2	Вируса гриппа птиц подтипа Н1-Н8, Н10-Н16 (IZSVe, Италия)	$\leq 1:4$
3	Вируса НВ (PMV1, IZSVe, Италия)	$\leq 1:4$
4	Вируса ССЯ-76 (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)	$\leq 1:4$
5	МГ, МС (GD, Нидерланды)	$\leq 1:4$

Примечание: титр антител « $\leq 4,0 \log_2$ » – отрицательный результат

Полученный лиофилизированный препарат антигена вируса гриппа птиц подтипа Н9 реагировал только со специфической сывороткой крови.

3.3.6.2 Получение положительной и нормальной контрольных сывороток крови. В качестве положительного контроля использовали специфическую к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 сыворотку крови кур. Для иммунизации 40-60 суточных кур, не имеющих антител к вирусу гриппа птиц, использовали очищенную инактивированную вируссодержащую суспензию, эмульгированную с равным объёмом адьюванта Монтанид ИЗА-70 (Франция). Иммунизацию кур проводили двукратно с интервалом 14 суток. Препарат в дозе 10^6 ЭИД₅₀/см³ вводили внутримышечно в объёме/ 1,0 см³. Через 10 суток после второй иммунизации определяли специфическую активность предварительно инактивированных сывороток в РТГА.

В качестве отрицательного контроля использовали нормальную сыворотку крови кур, которую получали путём обескровливания здоровой птицы, не имеющей антител к вирусу гриппа птиц.

Активность и специфичность полученных контрольных сывороток после лиофилизации проверяли в РТГА с гомо- и гетерологичными антигенами производства Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve), Института Royal GD (GD) и ФГБУ «ВНИИЗЖ» (таблица 15).

Таблица 15 - Исследование активности и специфичности контрольных сывороток крови в РТГА с различными гемагглютинирующими антигенами

№	Референтный антиген:	Титр антител к вирусу ГП подтипа Н9 в РТГА, log ₂ (n=3)	
		Отрицательная контрольная сыворотка	Положительная контрольная сыворотка
1	Вируса гриппа птиц подтипа Н9 (IZSve, Италия)	≤1:4	8,3±0,33
2	Вируса гриппа птиц подтипа Н1-Н8, Н10-Н16 (IZSve, Италия)	≤1:4	≤1:4
3	Вируса НВ (PMV1, IZSve, Италия)	≤1:4	≤1:4
4	Вируса ССЯ-76 (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)	≤1:4	≤1:4
5	МГ, МС (GD, Нидерланды)	≤1:4	≤1:4
6	K ⁺	≤1:4	7,3±0,33

Примечание: «K⁺» - положительный контроль
титр антител «≤4,0 log₂» – отрицательный результат

Активность полученной инаktivированной лиофилизированной гипериммунной сыворотки в РТГА со специфическим антигеном вируса гриппа птиц подтипа Н9 составила $8,3 \pm 0,33 \log_2$. Активность отрицательной контрольной сыворотки показала отрицательный результат для всех антигенов.

В состав набора, кроме необходимых иммуноспецифических компонентов, были включены химические реагенты: набор солей для приготовления забуференного физиологического раствора (натрий хлористый, натрий фосфорнокислый двузамещённый, калий фосфорнокислый однозамещённый) и соль натрия лимоннокислого для отбора крови с целью получения эритроцитов.

Таким образом, в ходе проделанной работы были подготовлены иммуноспецифические и неспецифические компоненты набора, необходимые для изготовления экспериментальной серии набора.

3.3.7 Определение основных валидационных характеристик разработанного набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в реакции торможения гемагглютинации

К основным валидационным характеристикам метода относятся специфичность, чувствительность, а также правильность (точность) и воспроизводимость результатов исследования. Для оценки эффективности метода используют несколько способов, в том числе сравнение с результатами, полученными другим методом, и межлабораторные сличительные испытания [151].

Для определения специфичности разрабатываемого набора сыворотки крови от невакцинированных СПФ-цыплят 3-х недельного возраста исследовали в РТГА с использованием антигена Н9 из тестируемого набора и антигенов производства Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe, Италия) и Института Royal GD (GD, Нидерланды). Ранее сыворотки были проверены в ИФА с помощью диагностического набора производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Результаты представлены в таблице 16.

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, гриппа птиц подтипов H1-H16 IZSVe (Италия) и GD (Нидерланды) и микоплазм. Результаты представлены в таблице 17.

Было показано, что активность антигена вируса гриппа птиц подтипа H9 с гетерологичными сыворотками не превышала фоновый уровень (реакция с неиммунной сывороткой). Гомологичные сыворотки крови кур к вирусу гриппа птиц подтипа H9 различных производителей показали положительный результат.

Таблица 16 – Исследование сывороток крови от невакцинированных цыплят

Результат РТГА с антигеном	Положительные/исследованные	Среднее значение титра антител, $\log_2$ (n=3)	Титр антител отрицательной контрольной сыворотки к вирусу H9N2 (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)	Титр антител положительной контрольной сыворотки к вирусу H9N2 (ФГБУ «ВНИИЗЖ») $\log_2$ (n=3)
H9N2 (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)	0/30	1,1±0,09	≤1:2	10,3
H9 (GD, Нидерланды)	0/30	1,3±0,09	≤1:2	10,0
H9N2 (IZSVe, Италия)	0/30	0,73±0,08	≤1:2	8,0
Результат ИФА	0/30	186±2,66	198	6828

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

Таблица 17 - Исследование в РТГА референтных гомо- и гетерологичных сывороток крови кур с антигеном вируса гриппа птиц подтипа H9

№	Сыворотка против:	Титр антител к вирусу ГП подтипа H9, $\log_2$ (n=3)
1	Вируса ГП подтипа H9 (IZSVe, Италия)	8,3±0,33
2	Вируса ГП подтипа H9 (GD, Нидерланды)	8,7±0,33
3	Вируса ГП подтипа H1-H8 (IZSVe, Италия)	≤2
4	Вируса ГП подтипа H10-H16 (IZSVe, Италия)	≤2
5	Вируса НБ (PMV1, IZSVe, Италия)	≤2
6	Вируса ССЯ-76 (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)	≤2
7	МГ, МС (GD, Нидерланды)	≤2
8	Отрицательная контрольная сыворотка	≤2
9	Положительная контрольная сыворотка	10,7±0,33

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

Определение чувствительности. Для сравнения результатов разрабатываемого набора и РТГА с применением антигена вируса гриппа птиц подтипа Н9 другого производителя было исследовано 3772 сыворотки крови цыплят одного из птицевладельцев РФ, привитых экспериментальным образцом инактивированной вакциной против гриппа птиц подтипа Н9, 125 сывороток крови были исследованы от контрольных (не вакцинированных против гриппа) кур. Птицы были привиты в суточном возрасте, отбор сывороток крови проводили через 30-35 суток после вакцинации. Все пробы предварительно были исследованы в ИФА с использованием «Набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц при тестировании сывороток крови в одном разведении» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Результаты параллельного исследования сывороток на наличие антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 представлены в таблицах 18 и 19.

Таблица 18 – Выявление антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови от вакцинированных кур

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 кур	3697/3772	3658/3772	3696/3772
отрицательный контроль	-	-	-
положительный контроль	+	+	+

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

Таблица 19 - Выявление антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови от не вакцинированных кур

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

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

Результаты исследования сывороток от вакцинированных кур в методах ИФА и РТГА были схожи. В РТГА с антигеном производства GD (Нидерланды) было получено 73 положительных результата, в РТГА с антигеном из разрабатываемого набора – 74. Одинаковые результаты были получены методом ИФА и в РТГА с антигеном из разрабатываемого набора.

Сравнение чувствительности и специфичности РТГА для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови кур при использовании антигена другого производителя представлены в таблице 20.

Таблица 20 - Сравнение чувствительности и специфичности РТГА для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа 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%

Определение воспроизводимости и правильности результатов.

Воспроизводимость РТГА 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 дней двумя операторами (на 12 планшетах) (таблица 21).

Таблица 21 - Исследования сывороток крови в РТГА при тестировании проб в одной и нескольких постановках реакции

Уровень антител к вирусу гриппа птиц Н9 в сыворотке крови	n=3 (3 планшета)		n=3x4 (12 планшето)	
	Средний титр антител, log ₂	Средний КВ	Средний титр антител, log ₂	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

Примечание: титр антител «≤4,0 log₂» – отрицательный результат

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 %.

Определение правильности (точности) результатов в РТГА испытуемого диагностического набора проводили по панели сывороток Proficiency Testing (PT), организованном в 2018 г. лабораторией *Dutch Animal Health Service, Deventer (R&D GD)*, Нидерланды. Для исследования была представлена панель сывороток крови кур, содержащая 8 лиофилизированных образцов. Результаты тестирования сывороток крови в РТГА представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Результаты тестирования панели сывороток РТ AIV-2018 в РТГА с антигеном вируса гриппа подтипа Н9

№	Характеристика образца	Результат в РТГА	
		1-я повторность	2-я повторность
1-5	Сыворотки крови от вакцинированных кур (инактивированные штаммы вирусов гриппа птиц подтипов Н5, Н6, Н7)	-	-
6	Сыворотка крови от невакцинированных СПФ-бройлеров в возрасте 10 недель	-	-
7	Сыворотка крови от вакцинированных кур против гриппа птиц (подтип Н7)	-	-
8	Сыворотка крови от инфицированных кур вирусом Н9N2	+	+

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

Статус проб в РТГА совпадал с данными, предоставленными другими лабораториями - участниками РТ.

Следующее тестирование проводили по панели сывороток, предоставленных Референтной лабораторией Европейского Союза по гриппу птиц и ньюкаслской болезни (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie), Италия (таблица 23). В результате тестирования 10 сывороток тестируемым набором антитела к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 были обнаружены только в образце № 8, т.е. была подтверждена специфичность и точность определения статуса положительных и отрицательных к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 сывороток крови птиц. По

полученным результатам можно сделать вывод о близком антигенном родстве между антигенами производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» и GD, Нидерланды.

Таблица 23 - Результаты тестирования панели сывороток IZSVe (Италия) в РТГА с антигеном вируса гриппа подтипа H9

№	Характеристика образца	Результат в РТГА	
		1-я повторность	2-я повторность
1	Сыворотка крови к вирусу гриппа A/H5N1	-	-
2	Нормальная сыворотка крови	-	-
3	Сыворотка крови к вирусу гриппа A/H5N8	-	-
4	Сыворотка крови к вирусу APMV-1 (НБ)	-	-
5	Сыворотка крови к вирусу A/H7N3	-	-
6	Нормальная сыворотка крови	-	-
7	Сыворотка крови к вирусу A/H5N9	-	-
8	Сыворотка крови к вирусу A/H9N2	+	+
9	Сыворотка крови к вирусу APMV-1 (НБ)	-	-
10	Сыворотка крови к вирусу A/H7N1	-	-

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

В результате проведенной оценки испытуемый набор показал высокую специфичность и чувствительность (100% и 98%, соответственно), воспроизводимость (коэффициент вариации не более 10 % между разными сериями анализа) и правильность. Высокая точность выявления антител (98 %) позволяет использовать его как эффективный инструмент для проведения диагностических исследований, оценки иммунного статуса птицы и контроля поствакцинального иммунитета.

3.3.8 Оценка стабильности иммуноспецифических компонентов набора при хранении

Стабильность препарата антигена и контрольных сывороток крови при хранении является одним из необходимых условий для получения воспроизводимых и достоверных результатов РТГА. Возможность хранения иммуноспецифических компонентов тестируемого диагностического набора в лиофилизированном состоянии при разных температурных режимах

проводили путём постановки РГА и РТГА. Полученные результаты исследования активности антигена представлены в таблице 24.

Таблица 24 - Активность лиофилизированного препарата антигена в зависимости от времени и температуры хранения

Срок хранения	Температура	Титр в РГА, $\log_2$ (n=3)
До хранения		10,0 $\pm$ 0,00
1 месяц	25°C	10,0 $\pm$ 0,00
	4°C	10,0 $\pm$ 0,00
3 месяца	25°C	9,0 $\pm$ 0,00
	4°C	10,0 $\pm$ 0,00
6 месяцев	25°C	8,0 $\pm$ 0,00
	4°C	10 $\pm$ 0,00
9 месяцев	25°C	7,0 $\pm$ 0,00
	4°C	10,0 $\pm$ 0,00
12 месяцев	25°C	5,0 $\pm$ 0,00
	4°C	10,0 $\pm$ 0,00
24 месяца	25°C	4,0 $\pm$ 0,00
	4°C	9,0 $\pm$ 0,00

Примечение: титр антител « $\leq 4,0 \log_2$ » – отрицательный результат

Из данных, представленных в таблице, следует, что активность лиофилизированного антигена сохранялась на одном уровне в течение 12 месяцев хранения при температуре 4°C.

Результаты исследования активности лиофилизированных препаратов контрольных сывороток представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Активность лиофилизированных контрольных сывороток крови в РТГА в зависимости от времени и температуры хранения

Срок хранения	Температура	Титр контрольных сывороток в РТГА, log ₂ (n=3)	
		Положительная	Отрицательная
До хранения		8,0 ±0,00	≤ 2,0
1 месяц	25°C	8,0 ±0,00	≤ 2,0
	4°C	8,0 ±0,00	≤ 2,0
3 месяца	25°C	7,0 ±0,00	≤ 2,0
	4°C	8,0 ±0,00	≤ 2,0
6 месяцев	25°C	5,0 ±0,00	≤ 2,0
	4°C	8,0 ±0,00	≤ 2,0
9 месяцев	25°C	4,0 ±0,00	≤ 2,0
	4°C	8,0 ±0,00	≤ 2,0
12 месяцев	25°C	4,0 ±0,00	≤ 2,0
	4°C	8,0 ±0,00	≤ 2,0
24 месяца	25°C	4,0 ±0,00	≤ 2,0
	4°C	8,0 ±0,00	≤ 2,0

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

Для изучения активности антигена и сывороток при хранении в растворённом состоянии препараты растворяли непосредственно перед первым исследованием. Далее препараты хранили при различных температурных режимах в растворённом состоянии. Активность растворённого антигена при температуре хранения 4°C оставалась на исходном уровне в течение 1 месяца, а затем постепенно снижалась. Следовательно, сроком хранения антигена в растворённом состоянии следует считать не менее 30 суток при температуре 4°C.

Активность контрольных сывороток в разведённом виде сохранялась при хранении в течение 1 месяца при 4°C.

В результате проведённых исследований по хранению лиофилизированных иммуноспецифических препаратов был установлен срок годности набора - 12 месяцев с даты изготовления при хранении и транспортировании при температуре от 2°C до 8°C. Срок хранения растворённых препаратов антигена и контрольных сывороток при температуре 4°C не более одного месяца является оптимальным.

3.3.9 Применение разработанного набора для оценки уровня антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в популяциях сельскохозяйственных, синантропных и диких птиц

20 кур в возрасте 60 суток были иммунизированы антигеном вируса гриппа А/Н9 штамм «А/chicken/Primorsk/419/2018 Н9N2», эмульгированным с адъювантом IZA-70. 5 кур содержались в отдельном изоляторе в качестве отрицательного контроля. Отбор крови для исследования в РТГА проводили через 14 и 28 суток после иммунизации. Результаты представлены в таблице 26.

Таблица 26 - Выявление антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови в различные сроки после иммунизации

Группа птиц	Среднее значение титра антител в РТГА с антигеном Н9 (log ₂)			
	ФГБУ «ВНИИЗЖ»		GD, Нидерланды	
	через 14 суток	через 28 суток	через 14 суток	через 28 суток
Опытная	5,85±0,16	8,15±0,13	5,0±0,15	6,55±0,17
Контрольная	1,2±0,1	1,47±0,12	1,2±0,1	1,47±0,12

Наличие антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 было обнаружено в реакции с использованием обоих антигенов различных производителей, но средний титр антител по группе был выше при использовании разработанного набора.

Выявление антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови от разных видов птиц. С использованием разработанного набора было исследовано 160 сывороток крови кур, принадлежащих двум птицеводческим хозяйствам закрытого типа из Дальневосточного региона РФ, применяющим вакцинацию против низкопатогенного гриппа птиц подтипа Н9. Пробы были отобраны не ранее, чем через 18 суток после вакцинации. Полученные результаты представлены в таблице 27. Во всех сыворотках крови (100%) были обнаружены специфические антитела. В сыворотках крови от не вакцинированных кур антитела к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 не были выявлены.

Таблица 27 - Выявление антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови кур промышленных хозяйств

Регион	Возраст птицы, сутки	Время после вакцинации, сутки	Средний титр антител, $\log_2$	Количество положительных результатов/общее количество проб
Амурская область	38-39	30	$6,77 \pm 0,26$	60/60
Амурская область	38-40	18-20	$6,99 \pm 0,16$	60/60
Приморский край	170	более 30	$8,69 \pm 0,17$	40/40
Владимирская область	38-42	не вакцинированы	$1,45 \pm 0,16$	0/100
Всего:				160/260

С использованием разработанного набора при исследовании 150 сывороток крови от кур из ЛПХ граждан 3-х субъектов РФ антитела к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 были обнаружены в 20 пробах из Центрального Федерального округа (таблица 28).

При повторном тестировании положительных проб в РТГА с антигеном фирмы GD, Нидерланды антитела были выявлены только в 17 пробах из 20, что в очередной раз свидетельствует о близком антигенном родстве используемого в наборе штамма вируса циркулирующим на территории РФ изолятам Н9N2.

Таблица 28 - Выявление антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови кур личных подсобных хозяйств в РТГА

Федеральный округ	Набор ФГБУ «ВНИИЗЖ»		Антиген Н9 GD, Нидерланды	
	Средний титр антител, $\log_2$	Общее количество проб/из них положительных	Средний титр антител, $\log_2$	Количество положительных проб/общее количество проб
Центральный	4,35±0,1	20/20	3,95±0,1	17/20
Центральный	≤2	0/50	≤2	0/50
Южный	≤2	0/30	≤2	0/30
Уральский	≤1	0/50	≤2	0/50
Всего:		20/150		17/150

Для тестирования были использованы 100 проб сыворотки крови от гусей, не привитых против гриппа птиц, из двух хозяйств Приволжского ФО (таблица 29).

Таблица 29 - Выявление антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 в сыворотках крови гусей в РТГА

№ группы сывороток	Набор ФГБУ «ВНИИЗЖ»	Антиген Н9 GD, Нидерланды
	Количество положительных проб/общее количество проб	Количество положительных проб/общее количество проб
1	13/21	8/21
2	8/21	8/21
3	4/29	2/29
4	6/29	2/29
Всего:	31/100	20/100

Антитела к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 были выявлены в 25 и 26 пробах крови при использовании разработанного набора и антигена вируса птиц подтипа Н9 фирмы GD, Нидерланды, соответственно, что может свидетельствовать о циркуляции вируса Н9N2 в хозяйствах.

При исследовании 216 проб сывороток крови от диких и синантропных птиц из трех ФО РФ антитела к вирусу гриппа птиц подтипа Н9 были обнаружены в 26 пробах сывороток крови от диких уток и гусей. Результаты представлены в таблице 30.

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.

Таблица 30 - 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

Таким образом, использование набора Н9-РТГА обеспечивает надежный контроль иммуногенной эффективности вакцинных препаратов против гриппа птиц подтипа Н9 и позволяет проводить серологический мониторинг распространения вируса гриппа подтипа Н9 в популяциях сельскохозяйственных, синантропных и диких птиц.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 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 H9N2 в ОТ-ПЦР-РВ обнаружен в 77 пробах, из них 15 идентифицированы как вирус гриппа птиц подтипа H9N2.

2. В результате анализа нуклеотидных последовательностей гена гемагглютиниона вирусов H9N2 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 H9N2, 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.

4.2 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/429/2021, A/chicken/Sverdlovsk/1436/2021 и A/chicken/Amur/1666/2023 позволяет предположить происхождение и проследить генетическую изменчивость вируса гриппа в сравнении с другими изолятами.

2. Проведено депонирование использованных в работе 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.

4.3 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.

5. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗЖ – Всемирная организация здоровья животных;

ГП – грипп птиц;

ГАЕ – гемагглютинирующая единица;

НГП – низкопатогенный грипп птиц;

КЭ – куриные эмбрионы;

СПФ-КЭ – свободные от специфической патогенной микрофлоры куриные эмбрионы;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

ОТ-ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени;

РГА – реакция гемагглютинации;

РТГА – реакция торможения гемагглютинации;

РТНА - реакция торможения нейраминидазной активности;

РФ – Российская Федерация;

СПФ – свободные от патогенной микрофлоры;

СТО – стандартная техническая документация;

ФБР – фосфатно-буферный раствор;

НА – гемагглютинин;

IVPI - индекс патогенности при внутривенном заражении;

LAMP – метод петлевой изометрической маплификации;

MDCK – клетки почек собаки Мадина-Дарби;

НА- нейраминидаза;

SA – сиаловая кислота;

ЭЭЖ – экстраэмбриональная жидкость.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бессарабов, Б. Ф. Инфекционные болезни животных / Б. Ф. Бессарабов, А. А. Вашутин, Е. С. Воронин; ред. А. А. Сидорчук. – Москва: КолосС, 2007. – 671 с.
2. Варкентин, А. В. Низкопатогенный грипп птиц, вызванный вирусом подтипа Н9. Обзор литературы / А. В. Варкентин, М. С. Волков, В. Н. Ирза // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2014. – Т. 12. – С. 41-53.
3. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов высокопатогенного гриппа птиц: утв. Минсельхозом РФ 24 марта 2021 г. N 158.
4. Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев, Н. В. Фомина. – Москва: ВНИТИБП, 2001. – 928 с.
5. Волков, М. С. О распространении вируса низкопатогенного гриппа А/Н9N2 в мире и на территории Российской Федерации. Проблемы искоренения болезни / М. С. Волков, А. В. Варкентин, В. Н. Ирза // Ветеринария Сегодня. – 2019. – № 3 (30). – С. 51-56.
6. Львов, Д. К. Грипп домашних птиц (классическая чума птиц) / Д. К. Львов, М. Ю. Щелканов, Т. И. Алипер // Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – Москва: Мед. информ. агентство, 2013. – С. 1104-1115.
7. Методические рекомендации по выделению и идентификации вирусов гриппа птиц и ньюкаслской болезни в развивающихся эмбрионах кур / В.Ю. Сосипаторова, П.Д. Жестков, А.А. Щербина и [др.]. - Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2025. - 35 с.
8. Методические рекомендации по выявлению РНК вируса гриппа птиц подтипа N2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени / П. Б. Акшалова, А. В. Андриясов, Л. О. Щербакова и [др.]. - Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2019. - 27 с.

9. Методические рекомендации по выявлению РНК вируса гриппа птиц типа А методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени / А. В. Андриясов, Е. В. Овчинникова, Л. О. Щербакова, [и др.]. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2024. – 29 с.

10. Методические рекомендации по определению первичной структуры гена Н изолятов вируса гриппа птиц подтипа Н9 с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования / А. В. Андриясов, В. Ю. Сосипаторова, Н. Г. Зиняков и [др.]. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2021. – 23 с.

11. Методические указания по диагностике заболеваний птиц с использованием серологических реакций / ред. Е. А. Непоклонов, Н. А. Власов, В. А. Грубый. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2015. – 364 с.

12. Обзор эпидемиологической ситуации по высокопатогенному вирусу гриппа птиц в России в 2018 г. / В. Ю. Марченко, Н. И. Гончарова, В. А. Евсеенко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 1. – С. 42-49.

13. Смирнова, Т. Д. Участие цитоскелета клетки в инфекционном цикле вирусов гриппа А / Т. Д. Смирнова, Д. М. Даниленко (Байбус), А. В. Слита // Цитология. – 2013. – Т. 55. – № 2. – С. 92-100.

14. Сравнение иммуногенной активности вакцин против низкопатогенного гриппа птиц подтипа Н9N2, изготовленных на основе вирусов генетических линий G1 и Y280 / С. В. Фролов, Л. О. Щербакова, Н. В. Мороз [и др.] // Ветеринария Сегодня. – 2021. – № 3 (38). – С. 224-229.

15. Троценко, Н. И. Практикум по ветеринарной вирусологии / Н. И. Троценко, Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская; ред. В. Н. Сайтаниди. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 2006. – 248 с.

16. ФГБУ «ВНИИЗЖ». Инструкция по ветеринарному применению вакцины ассоциированной против гриппа птиц (H9N2) и ньюкаслской болезни инактивированной эмульсионной: рег. удост. 12-1-2.20-4612№ПВР-1-13.14/03099 – URL:

<https://shop.arriah.ru/upload/iblock/949/km1k88wrf8jmi8pksqr1cz1dfouw36p6.pdf>

(дата обращения: 04.02.2026). – Текст: электронный.

17. ФГБУ «ВНИИЗЖ». Инструкция по ветеринарному применению вакцины против гриппа птиц (H9) инактивированной эмульсионной: рег. удост. 12-1-20.25-5373№ПВР-1-20.25/04124 – URL: <https://reestrinform.ru/reestr-veterinarykh-preparatov-rf/id-12-1-20.25-5373.html?ysclid=mm3ovivuj6954171134> (дата обращения: 04.02.2026). – Текст: электронный.

18. ФГБУ «ВНИИЗЖ». Инструкция по ветеринарному применению вакцины против ньюкаслской болезни («G7» и «Ла-Сота») и гриппа птиц H9N2 (Y280 и G1) ассоциированная инактивированная эмульсионная: рег. удост. № 12-1-03.24-5101№ПВР-1-03.24/03908 – URL: <https://shop.arriah.ru/upload/iblock/1ca/4gtu30huft9rpwumj6szqqtqxq7662w0k.pdf> (дата обращения: 04.02.2026). – Текст: электронный.

19. A broad spectrum, one-step reverse-transcription PCR amplification of the neuraminidase gene from multiple subtypes of influenza A virus / A. C. Alvarez, M. E. G. Brunck, V. Boyd [et al.] // *Virology Journal*. – 2008. – Vol. 5. – P. 1-11.

20. A G1-lineage H9N2 virus with oviduct tropism causes chronic pathological changes in the infundibulum and a long-lasting drop in egg production / F. Bonfante, E. Mazzetto, C. Zanardello [et al.] // *Veterinary Research*. – 2018. – Vol. 49. – № 1. – P. 1-16.

21. A Global perspective on H9N2 avian influenza virus / T. H. P. Peacock, J. James, J. E. Sealy, M. Iqbal // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – № 7. – P. 1-28.

22. A new nanobody-enzyme fusion protein-linked immunoassay for detecting antibodies against influenza A virus in different species / P. Ji, K. Wang, L. Zhang [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2022. – Vol. 298. – № 12. – P. 1-14.

23. A novel highly pathogenic H5N8 avian influenza virus isolated from a wild duck in China / S. Fan, L. Zhou, D. Wu [et al.] // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2014. – Vol. 8. – № 6. – P. 646-653.

24. Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902-2013): frequency and distribution of M2 gene mutations / G. Dong, C. Peng, J. Luo [et al.] // *PloS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 3. – P. 1-20.

25. Adaptive mutations in HA of avian H9N2 influenza viruses facilitate their transmission to swine / J. Wang, P. Chen, Q. Liu [et al.] // *Veterinary Research*. – 2025. – Vol. 57. – № 1. – P. 1-13.
26. Alexander, D. J. Report on avian influenza in the Eastern Hemisphere during 1997-2002 / D. J. Alexander // *Avian Diseases*. – 2003. – Vol. 47. – № 3 Suppl. – P. 792-797.
27. Alexander, D. J. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002-2006 / D. J. Alexander // *Avian Diseases*. – 2007. – Vol. 51. – № 1 Suppl. – P. 161-166.
28. Analysis of Avian Orthoavulavirus 1 Detected in the Russian Federation between 2017 and 2021 / N. A. Guseva, S. N. Kolosov, N. G. Zinyakov [et al.] // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 6. – P. 1032.
29. Avian influenza A (H9N2): computational molecular analysis and phylogenetic characterization of viral surface proteins isolated between 1997 and 2009 from the human population / A. M. Butt, S. Siddique, M. Idrees, Y. Tong // *Virology Journal*. – 2010. – Vol. 7. – Avian influenza A (H9N2). – P. 1-11.
30. Avian influenza and ban on overnight poultry storage in live poultry markets, Hong Kong / Y. H. C. Leung, E. H. Y. Lau, L. J. Zhang [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 18. – № 8. – P. 1339-1341.
31. Avian influenza H9N2 subtype in Ghana: virus characterization and evidence of co-infection / J. A. Awuni, A. Bianco, O. J. Dogbey [et al.] // *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* – 2019. – Vol. 48. – № 5. – P. 470-476.
32. Avian Influenza: Strategies to Manage an Outbreak / A. Simancas-Racines, S. Cadena-Ullauri, P. Guevara-Ramírez [et al.] // *Pathogens*. – 2023. – Vol. 12. – № 4. – P. 1-17.
33. Avian influenza virus in water: infectivity is dependent on pH, salinity and temperature / J. D. Brown, G. Goekjian, R. Poulson [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2009. – Vol. 136. – № 1-2. – P. 20-26.

34. Azeem, S. Diagnostic assays for avian influenza virus surveillance and monitoring in poultry / S. Azeem, K.-J. Yoon // *Viruses*. – 2025. – Vol. 17. – № 2. – P. 1-25.
35. Baigent, S. J. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission / S. J. Baigent, J. W. McCauley // *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. – 2003. – Vol. 25. – № 7. – P. 657-671.
36. Bat-borne H9N2 influenza virus evades MxA restriction and exhibits efficient replication and transmission in ferrets / N. J. Halwe, L. Hamberger, J. Sehl-Ewert [et al.] // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 1-8.
37. Bouvier, N. M. The biology of influenza viruses / N. M. Bouvier, P. Palese // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – № Suppl 4. – P. 49-53.
38. Brown, I. H. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, and Africa, 2006-2009 / I. H. Brown // *Avian Diseases*. – 2010. – Vol. 54. – № 1 Suppl. – P. 187-193.
39. Cáceres, C. J. Airborne transmission of avian origin H9N2 influenza A viruses in mammals / C. J. Cáceres, D. S. Rajao, D. R. Perez // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 10. – P. 1-18.
40. Capua, I. Avian influenza infection in birds: a challenge and opportunity for the poultry veterinarian / I. Capua, D. J. Alexander // *Poultry Science*. – 2009. – Vol. 88. – № 4. – P. 842-846.
41. Capua, I. Clinical traits and pathology of avian influenza infections, guidelines for farm visit and differential diagnosis / I. Capua, C. Terregino // *Avian Influenza and Newcastle Disease* / eds. I. Capua, D. J. Alexander. – Milano: Springer Milan, 2009. – P. 45-71.
42. Carnaccini, S. H9 influenza viruses: an emerging challenge / S. Carnaccini, D. R. Perez // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2020. – Vol. 10. – № 6. – P. 1-33.

43. Changes in apoptosis, proliferation and T lymphocyte subtype on thymic cells of SPF chickens infected with reticuloendotheliosis virus / L. Fu, X. Wang, J. Zhai [et al.] // *Molecular Immunology*. – 2019. – Vol. 111. – P. 87-94.
44. Characterization of avian H9N2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003 / U. B. Aamir, U. Wernery, N. Ilyushina, R. G. Webster // *Virology*. – 2007. – Vol. 361. – № 1. – P. 45-55.
45. Characterization of avian influenza and newcastle disease viruses from poultry in Libya / A. Kammon, A. Heidari, A. Dayhum [et al.] // *Avian Diseases*. – 2015. – Vol. 59. – № 3. – P. 422-430.
46. Characterization of H9N2 avian influenza virus isolated from chickens and waterfowl in parts of Southern China from 2018 to April 2024 / W. Zhou, J. He, F. Qiao [et al.] // *Poultry Science*. – 2025. – Vol. 104. – № 10. – P. 1-12.
47. Characterization of low pathogenic avian influenza virus subtype H9N2 isolated from free-living mynah birds (*Acridotheres tristis*) in the Sultanate of Oman / M. H. Body, A. H. Alrarawahi, S. S. Alhubsy [et al.] // *Avian Diseases*. – 2015. – Vol. 59. – № 2. – P. 329-334.
48. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia / Y. J. Guo, S. Krauss, D. A. Senne [et al.] // *Virology*. – 2000. – Vol. 267. – № 2. – P. 279-288.
49. Chinese and global distribution of H9 subtype avian influenza viruses / W. Jiang, S. Liu, G. Hou [et al.] // *PloS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 12. – P. 1-8.
50. Co-infection of broilers with *Ornithobacterium rhinotracheale* and H9N2 avian influenza virus / Q. Pan, A. Liu, F. Zhang [et al.] // *BMC veterinary research*. – 2012. – Vol. 8. – P. 104.
51. Coinfection of chickens with H9N2 and H7N9 avian influenza viruses leads to emergence of reassortant H9N9 virus with increased fitness for poultry and a zoonotic potential / S. Bhat, J. James, J.-R. Sadeyen [et al.] // *Journal of Virology*. – 2022. – Vol. 96. – № 5. – P. 1-25.

52. Co-infection of *Salmonella enteritidis* with H9N2 avian influenza virus in chickens / N. Arafat, S. Abd El Rahman, D. Naguib [et al.] // *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* – 2020. – Vol. 49. – № 5. – P. 496-506.

53. Co-infection of *Staphylococcus aureus* or *Haemophilus paragallinarum* exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens / N. Kishida, Y. Sakoda, M. Eto [et al.] // *Archives of Virology.* – 2004. – Vol. 149. – № 11. – P. 2095-2104.

54. Comparative analysis of key immune protection factors in H9N2 avian influenza viruses infected and immunized specific pathogen-free chicken / M. Dai, S. Li, null Keyi Shi [et al.] // *Poultry Science.* – 2021. – Vol. 100. – № 1. – P. 39-46.

55. Development and preliminary application of an indirect ELISA for detecting antibodies against Avian Influenza Virus / G. Wang, J. Ding, S. Hu, X. Yang // *Research in Veterinary Science.* – 2012. – Vol. 93. – № 2. – P. 710-715.

56. Development of a multiplex probe combination-based one-step real-time reverse transcription-PCR for NA subtype typing of avian influenza virus / Z. Sun, T. Qin, F. Meng [et al.] // *Scientific Reports.* – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-11.

57. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes / E. Spackman, D. A. Senne, T. J. Myers [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2002. – Vol. 40. – № 9. – P. 3256-3260.

58. Discordant detection of avian influenza virus subtypes in time and space between poultry and wild birds; Towards improvement of surveillance programs / J. H. Verhagen, P. Lexmond, O. Vuong [et al.] // *PloS One.* – 2017. – Vol. 12. – № 3. – P. 1-21.

59. Effects of reticuloendotheliosis virus infection on cytokine production in SPF chickens / M. Xue, X. Shi, Y. Zhao [et al.] // *PloS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 12. – P. 1-10.

60. Emerging adaptation of BJ/94 lineage H9N2 viruses to waterfowl: insights into enhanced replication and immune activation in the host cells / J. Wu, P. Chen, L. Liu [et al.] // *Poultry Science.* – 2026. – Vol. 105. – № 1. – P. 1-9.

61. Enhanced replication of a contemporary avian influenza A H9N2 virus in human respiratory organoids / L.-L. Chen, J. D. Ip, W.-M. Chan [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2025. – Vol. 14. – № 1. – P. 1-14.

62. Epidemiology and evolutionary dynamics of H9N2 avian influenza virus in Bangladesh / A. Islam, E. Amin, M. A. Khan [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2025. – Vol. 14. – № 1. – P. 1-14.

63. Establishing a multicolor flow cytometry to characterize cellular immune response in chickens following H7N9 avian influenza virus infection / X. Hao, S. Li, L. Chen [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 12. – P. 1-16.

64. Evolution and molecular epidemiology of H9N2 influenza A viruses from quail in southern China, 2000 to 2005 / K. M. Xu, K. S. Li, G. J. D. Smith [et al.] // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 6. – P. 2635-2645.

65. Evolution and spread of Y280-lineage H9N2 low pathogenicity avian influenza viruses in Korea, 2020-2023 / A. Y. Cho, T.-H. Kim, H. Lee [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2025. – Vol. 2025. – P. 1-10.

66. First outbreaks and phylogenetic analyses of avian influenza H9N2 viruses isolated from poultry flocks in Morocco / M. El Houadfi, S. Fellahi, S. Nassik [et al.] // *Virology Journal*. – 2016. – Vol. 13. – № 1. – P. 1-7.

67. Flock-based surveillance for low pathogenic avian influenza virus in commercial breeders and layers, southwest Nigeria / D. O. Oluwayelu, A. Omolanwa, A. I. Adebiyi, O. C. Aiki-Raji // *African Journal of Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 11. – № 1. – P. 44-49.

68. França, M. S. Influenza pathobiology and pathogenesis in avian species / M. S. França, J. D. Brown // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2014. – Vol. 385. – P. 221-242.

69. Full-genome analysis of avian influenza virus H9N2 from Bangladesh reveals internal gene reassortments with two distinct highly pathogenic avian influenza viruses / R. Parvin, K. Heenemann, M. Y. Halami [et al.] // *Archives of Virology*. – 2014. – Vol. 159. – № 7. – P. 1651-1661.

70. Genesis of avian influenza H9N2 in Bangladesh / K. Shanmuganatham, M. M. Feeroz, L. Jones-Engel [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2014. – Vol. 3. – № 12. – P. 1-17.
71. Genetic analysis of H9N2 avian influenza viruses circulated in broiler flocks: a case study in Iraq in 2014-2015 / Q. A. Kraidi, O. Madadgar, A. Ghalyanchi Langeroudi, V. Karimi // *Virus Genes*. – 2017. – Vol. 53. – № 2. – P. 205-214.
72. Genetic and molecular characterization of avian influenza A(H9N2) viruses from live bird markets (LBM) in Senegal / M. M. Jallow, M. M. Diagne, M. H. D. Ndione [et al.] // *Viruses*. – 2025. – Vol. 17. – № 1. – P. 1-18.
73. Genetic and molecular characterization of H9N2 avian influenza viruses isolated from live poultry markets in Hubei province, Central China, 2013-2017 / Z. Hu, F. Peng, Z. Xiong [et al.] // *Virologica Sinica*. – 2021. – Vol. 36. – № 2. – P. 291-299.
74. Genetic characterization of a new candidate hemagglutinin subtype of influenza A viruses / S. Fereidouni, E. Starick, K. Karamendin [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2023. – Vol. 12. – № 2. – P. 1-9.
75. Genetic characterization of H9N2 avian influenza viruses isolated from poultry in Poland during 2013/2014 / E. Świątoń, M. Jóźwiak, Z. Minta, K. Śmietanka // *Virus Genes*. – 2018. – Vol. 54. – № 1. – P. 67-76.
76. Genetic characterization of HA gene of low pathogenic H9N2 influenza viruses isolated in Israel during 2006-2012 periods / I. Davidson, I. Shkoda, N. Golender [et al.] // *Virus Genes*. – 2013. – Vol. 46. – № 2. – P. 255-263.
77. Genetic comparison of H9N2 AI viruses isolated in Jordan in 2003 / I. Monne, G. Cattoli, E. Mazzacan [et al.] // *Avian Diseases*. – 2007. – Vol. 51. – № 1 Suppl. – P. 451-454.
78. Genetic conservation of hemagglutinin gene of H9 influenza virus in chicken population in Mainland China / J.-H. Liu, K. Okazaki, A. Mweene [et al.] // *Virus Genes*. – 2004. – Vol. 29. – № 3. – P. 329-334.
79. Genetic evolution of H5 highly pathogenic avian influenza virus in domestic poultry in Vietnam between 2011 and 2013 / E.-K. Lee, H.-M. Kang, K.-I. Kim [et al.] // *Poultry Science*. – 2015. – Vol. 94. – № 4. – P. 650-661.

80. Genetic evolution of low pathogenecity H9N2 avian influenza viruses in Tunisia: acquisition of new mutations / W. Tombari, J. Nsiri, I. Larbi [et al.] // *Virology Journal*. – 2011. – Vol. 8. – P. 1-12.

81. Genotypic evolution and epidemiological characteristics of H9N2 influenza virus in Shandong Province, China / Y. Li, M. Liu, Q. Sun [et al.] // *Poultry Science*. – 2019. – Vol. 98. – № 9. – P. 3488-3495.

82. H9N2 influenza A virus circulates in H5N1 endemically infected poultry population in Egypt / I. Monne, H. A. Hussein, A. Fusaro [et al.] // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2013. – Vol. 7. – № 3. – P. 240-243.

83. H9N2 influenza viruses from Israeli poultry: a five-year outbreak / C. Banet-Noach, S. Perk, L. Simanov [et al.] // *Avian Diseases*. – 2007. – Vol. 51. – № 1 Suppl. – P. 290-296.

84. H9N2 subtype influenza A viruses in poultry in pakistan are closely related to the H9N2 viruses responsible for human infection in Hong Kong / K. R. Cameron, V. Gregory, J. Banks [et al.] // *Virology*. – 2000. – Vol. 278. – № 1. – P. 36-41.

85. Human infection with H9N2 avian influenza in northern China / Y. Pan, S. Cui, Y. Sun [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2018. – Vol. 24. – № 3. – P. 321-323.

86. ICTV. Orthomyxoviridae. – URL: https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Orthomyxoviridae (date accessed: 11.02.2026). – Text: electronic.

87. ICTV. Taxon Details. Alphainfluenzavirus influenzae. – URL: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202403956&taxon_name=Alphainfluenzavirus%20influenzae (date accessed: 11.02.2026). – Text: electronic.

88. Induction of immune response in chickens primed in ovo with an inactivated H9N2 avian influenza virus vaccine / J. Astill, T. Alkie, A. Yitbarek [et al.] // *BMC research notes*. – 2018. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-7.

89. Infectivity and transmissibility of H9N2 avian influenza virus in chickens and wild terrestrial birds / M. Iqbal, T. Yaqub, N. Mukhtar [et al.] // *Veterinary Research*. – 2013. – Vol. 44. – № 1. – P. 1-10.

90. Inferring host roles in bayesian phylodynamics of global avian influenza A virus H9N2 / J. Yang, D. Xie, Z. Nie [et al.] // *Virology*. – 2019. – Vol. 538. – P. 86-96.
91. Influenza / F. Krammer, G. J. D. Smith, R. A. M. Fouchier [et al.] // *Nature Reviews. Disease Primers*. – 2018. – Vol. 4. – № 1. – P. 1-21.
92. Influenza a virus antiparallel helical nucleocapsid-like pseudo-atomic structure / F. Chenavier, E. Zarkadas, L.-L. Freslon [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2025. – Vol. 53. – № 3. – P. 1-10.
93. Influenza virus neuraminidase structure and functions / J. L. McAuley, B. P. Gilbertson, S. Trifkovic [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1-13.
94. Is the occurrence of avian influenza virus in Charadriiformes species and location dependent? / B. A. Hanson, M. P. Luttrell, V. H. Goekjian [et al.] // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2008. – Vol. 44. – № 2. – P. 351-361.
95. Isolation, characterization and phylogenetic analyses of avian influenza A (H9N2) viruses isolated from poultry between 2019 and 2023 in Egypt / Z. Mosaad, N. M. Hagag, M. M. Elsayed [et al.] // *BMC veterinary research*. – 2025. – Vol. 21. – № 1. – P. 1-18.
96. Keeler, S. P. Persistence of low pathogenic avian influenza viruses in filtered surface water from waterfowl habitats in Georgia, USA / S. P. Keeler, R. D. Berghaus, D. E. Stallknecht // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2012. – Vol. 48. – № 4. – P. 999-1009.
97. Lamb, R. A. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication / R. A. Lamb, R. M. Krug // *Fields Virology* / eds. D. M. Knipe [et al.]. – Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. – P. 1487-1531.
98. Lee, D.-H. H9N2 avian influenza virus in Korea: evolution and vaccination / D.-H. Lee, C.-S. Song // *Clinical and Experimental Vaccine Research*. – 2013. – Vol. 2. – № 1. – P. 26-33.
99. Liu, D. Poultry carrying H9N2 act as incubators for novel human avian influenza viruses / D. Liu, W. Shi, G. F. Gao // *Lancet*. – 2014. – Vol. 383. – № 9920. – P. 869.

100. Live bird markets of Bangladesh: H9N2 viruses and the near absence of highly pathogenic H5N1 influenza / N. J. Negovetich, M. M. Feeroz, L. Jones-Engel [et al.] // PloS one. – 2011. – Vol. 6. – Live bird markets of Bangladesh. – № 4. – P. 1-8.

101. Low pathogenic avian influenza H9N2 viruses in Morocco: antigenic and molecular evolution from 2021 to 2023 / O. Arbani, M. F. Ducatez, S. Mahmoudi [et al.] // Viruses. – 2023. – Vol. 15. – № 12. – P. 1-16.

102. Marché, S. Evaluation of different serologic markers for the early detection of avian influenza infection in chickens / S. Marché, B. Lambrecht, T. van den Berg // Avian Diseases. – 2010. – Vol. 54. – № 1 Suppl. – P. 690-698.

103. Molecular characteristics and genetic evolution of H9N2 avian influenza virus in eastern monsoon zone of China / L. Zhang, X. Shan, Y. Yin [et al.] // Microbial Pathogenesis. – 2025. – Vol. 207. – P. 1-7.

104. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the ‘internal’ genes of H5N1 viruses in Hong Kong? / Y. Guan, K. F. Shortridge, S. Krauss, R. G. Webster // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1999. – Vol. 96. – № 16. – P. 9363-9367.

105. Molecular detection and epidemiological distribution of poultry respiratory viral pathogens in commercial chicken flocks in Bangladesh / M. M. Uddin, A. Hasan, I. Hossain [et al.] // Poultry Science. – 2025. – Vol. 104. – № 2. – P. 1-5.

106. Molecular epidemiology of H9N2 influenza viruses in Northern Europe / E. Lindh, C. Ek-Kommonen, V.-M. Väänänen [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2014. – Vol. 172. – № 3-4. – P. 548-554.

107. Molecular evolution of H9N2 avian influenza viruses in Israel / I. Davidson, A. Fusaro, A. Heidari [et al.] // Virus Genes. – 2014. – Vol. 48. – № 3. – P. 457-463.

108. Nagy, A. A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa / A. Nagy, T. C. Mettenleiter, E. M. Abdelwhab // Epidemiology and Infection. – 2017. – Vol. 145. – № 16. – P. 3320-3333.

109. New world bats harbor diverse influenza A viruses / S. Tong, X. Zhu, Y. Li [et al.] // PLoS pathogens. – 2013. – Vol. 9. – № 10. – P. 1-12.

110. Nili, H. Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran / H. Nili, K. Asasi // *Avian Diseases*. – 2003. – Vol. 47. – № 3 Suppl. – P. 828-831.

111. Non-basic amino acids in the hemagglutinin proteolytic cleavage site of a European H9N2 avian influenza virus modulate virulence in turkeys / C. Blaurock, D. Scheibner, M. Landmann [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-14.

112. Novel genotypes of H9N2 influenza A viruses isolated from poultry in Pakistan containing NS genes similar to highly pathogenic H7N3 and H5N1 viruses / M. Iqbal, T. Yaqub, K. Reddy, J. W. McCauley // *PloS One*. – 2009. – Vol. 4. – № 6. – P. 1-18.

113. OIE. Infection with high pathogenicity avian influenza viruses / OIE // *Terrestrial Animal Health Code*. – 2024. – Vol. 10.4. – P. 1-12.

114. Origin, spread, and interspecies transmission of a dominant genotype of BJ/94 lineage H9N2 avian influenza viruses with increased threat / Y. Zhou, Y. Li, H. Chen [et al.] // *Virus Evolution*. – 2024. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-11.

115. Palese, P. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication / P. Palese // *Fields Virology* / eds. D. M. Knipe, Howley, P.M. – Philadelphia, PA, 2007. – P. 1647-1689.

116. Pathological changes, shedding pattern and cytokines responses in chicks infected with avian influenza-H9N2 and/or infectious bronchitis viruses / O. Mahana, A.-S. Arafa, A. Erfan [et al.] // *Virus Disease*. – 2019. – Vol. 30. – № 2. – P. 279-287.

117. Perelman, B. Using inactivated vaccines to control low pathogenic AI / B. Perelman // *World Poultry*. – 2009. – Vol. 25. – № 2. – P. 30-31.

118. Perez, D. R. Functional analysis of PA binding by influenza A virus PB1: effects on polymerase activity and viral infectivity / D. R. Perez, R. O. Donis // *Journal of Virology*. – 2001. – Vol. 75. – № 17. – P. 8127-8136.

119. Persistence of avian influenza virus (H9N2) on plastic surface / J. Meng, Q. Zhang, M. Ma [et al.] // *The Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 834. – P. 1-9.

120. Persistence of low pathogenic avian influenza virus in artificial streams mimicking natural conditions of waterfowl habitats in the Mediterranean climate / A. Perlas, K. Bertran, F. X. Abad [et al.] // *The Science of the Total Environment*. – 2023. – Vol. 863. – P. 1-9.

121. Phylogenetic analyses of genes from South African LPAI viruses isolated in 2004 from wild aquatic birds suggests introduction by Eurasian migrants / C. Abolnik, E. Cornelius, S. P. R. Bisschop [et al.] // *Developments in Biologicals*. – 2006. – Vol. 124. – P. 189-199.

122. Phylogenetic analysis of hemagglutinin genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from chickens in Shandong, China, between 1998 and 2013 / Y. Zhao, S. Li, Y. Zhou [et al.] // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-6.

123. Prevalence and diversity of H9N2 avian influenza in chickens of Northern Vietnam, 2014 / D. M. Thuy, T. P. Peacock, V. T. N. Bich [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2016. – Vol. 44. – P. 530-540.

124. Progress on chicken T cell immunity to viruses / M. Dai, C. Xu, W. Chen, M. Liao // *Cellular and molecular life sciences*. – 2019. – Vol. 76. – № 14. – P. 2779-2788.

125. Proposal for a global classification and nomenclature system for A/H9 influenza viruses / A. Fusaro, J. Pu, Y. Zhou [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 30. – № 8. – P. 1-13.

126. Prospective study of avian influenza H9 infection in commercial poultry farms of Punjab Province and Islamabad Capital Territory, Pakistan / M. Chaudhry, M. Ahmad, H. B. Rashid [et al.] // *Tropical Animal Health and Production*. – 2017. – Vol. 49. – № 1. – P. 213-220.

127. Rapid evolution of low-pathogenic H9N2 avian influenza viruses following poultry vaccination programmes / K. J. Park, H.-I. Kwon, M.-S. Song [et al.] // *The Journal of General Virology*. – 2011. – Vol. 92. – № Pt 1. – P. 36-50.

128. Revisiting cellular immune response to oncogenic Marek's disease virus: the rising of avian T-cell immunity / Y. Yang, M. Dong, X. Hao [et al.] // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. – 2020. – Vol. 77. – № 16. – P. 3103-3116.

129. Role of birds in transmitting zoonotic pathogens / Y. S. Malik, A. Arun Prince Milton, S. Ghatak, S. Ghosh. – Singapore: Livestock Diseases and Management, 2021. – 268 p.
130. Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chickens / D. R. Perez, W. Lim, J. P. Seiler [et al.] // *Journal of Virology*. – 2003. – Vol. 77. – № 5. – P. 3148-3156.
131. Seifi, S. Natural co-infection caused by avian influenza H9 subtype and infectious bronchitis viruses in broiler chicken farms / S. Seifi, K. Asasi, A. Mohammadi // *Veterinarski arhiv*. – 2010. – Vol. 80. – № 2. – P. 269-281.
132. Senne, D. A. Avian influenza in North and South America, 2002-2005 / D. A. Senne // *Avian Diseases*. – 2007. – Vol. 51. – № 1 Suppl. – P. 167-173.
133. Senne, D. A. Avian influenza in North and South America, the Caribbean, and Australia, 2006-2008 / D. A. Senne // *Avian Diseases*. – 2010. – Vol. 54. – № 1 Suppl. – P. 179-186.
134. Senne, D. A. Avian influenza in the Western Hemisphere including the Pacific Islands and Australia / D. A. Senne // *Avian Diseases*. – 2003. – Vol. 47. – № 3 Suppl. – P. 798-805.
135. Serologic evidence of avian influenza virus infections among Nigerian agricultural workers / J. Okoye, D. Eze, W. S. Krueger [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2013. – Vol. 85. – № 4. – P. 670-676.
136. Song, W. Human-infecting influenza A (H9N2) virus: a forgotten potential pandemic strain? / W. Song, K. Qin // *Zoonoses and Public Health*. – 2020. – Vol. 67. – № 3. – P. 203-212.
137. Spackman, E. Avian influenza virus isolation, propagation, and titration in embryonated chicken eggs / E. Spackman, M. L. Killian // *Methods in Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 2123. – P. 149-164.
138. Spackman, E. Detection and identification of the H5 hemagglutinin subtype by real-time RT-PCR / E. Spackman, D. L. Suarez // *Methods in Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 436. – P. 27-33.

139. Stallknecht, D. E. Ecology of avian influenza in wild birds / D. E. Stallknecht, J. D. Brown // *Avian Influenza* / ed. D. E. Swayne. – Ames, Iowa: Blackwell Pub, 2008. – P. 43-58.
140. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus / J. Stevens, O. Blixt, T. M. Tumpey [et al.] // *Science*. – 2006. – Vol. 312. – № 5772. – P. 404-410.
141. Suarez, D. L. Influenza A virus / D. L. Suarez // *Avian Influenza* / ed. D. E. Swayne. – Ames, Iowa: Blackwell Pub, 2008. – P. 3-22.
142. Sugimura, T. The susceptibility of culture cells to avian influenza viruses / T. Sugimura, Y. Murakami, T. Ogawa // *The Journal of Veterinary Medical Science*. – 2000. – Vol. 62. – № 6. – P. 659-660.
143. Summary of taxonomy changes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) from the Archaeal Viruses Subcommittee, 2025 / M. Krupovic, D. P. Baquero, E. A. Bignon [et al.] // *The Journal of General Virology*. – 2025. – Vol. 106. – № 7. – P. 1-8.
144. Surveillance and coinfection dynamics of infectious bronchitis virus and avian influenza H9N2 in Moroccan broiler farms (2021-2023): phylogenetic insights and impact on poultry health / R. Regragui, O. Arbani, N. Touil [et al.] // *Viruses*. – 2025. – Vol. 17. – № 6. – P. 1-17.
145. Swayne, D. E. Influenza / D. E. Swayne, D. A. Halvorson // *Diseases of Poultry* / eds. Y. M. Saif [et al.]. – Ames, IA: Iowa State University Press, 2008. – P. 153-184.
146. Swayne, D. E. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds / D. E. Swayne // *Avian Diseases*. – 2007. – Vol. 51. – № 1 Suppl. – P. 242-249.
147. Systematic identification of host immune key factors influencing viral infection in PBL of ALV-J infected SPF chicken / M. Dai, S. Li, K. Shi [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 1. – P. 1-15.

148. Taishan Pinus massoniana pollen polysaccharides enhance immune responses in chickens infected by avian leukosis virus subgroup B / S. Yang, G. Li, Z. Zhao [et al.] // Immunological Investigations. – 2018. – Vol. 47. – № 5. – P. 443-456.

149. The applications of live attenuated influenza A virus with modified NS1 gene / H. Zhang, L. Wang, Y. An, Z. Chen // Molecular Therapy. Nucleic Acids. – 2025. – Vol. 36. – № 1. – P. 1-17.

150. The Detection of a low pathogenicity avian influenza virus subtype H9 infection in a Turkey breeder flock in the United Kingdom / S. M. Reid, J. Banks, V. Ceeraz [et al.] // Avian Diseases. – 2016. – Vol. 60. – № 1 Suppl. – P. 126-131.

151. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology / H. F. Rabenau, H. H. Kessler, M. Kortenbusch [et al.] // Journal of Clinical Virology. – 2007. – Vol. 40. – № 2. – P. 93-98.

152. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) / E. J. Lefkowitz, D. M. Dempsey, R. C. Hendrickson [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2018. – Vol. 46. – № D1. – P. 708-717.

153. Wan, H. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells / H. Wan, D. R. Perez // Journal of Virology. – 2007. – Vol. 81. – № 10. – P. 5181-5191.

154. WOAHA. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses) / WOAHA // Terrestrial Manual. – 2021. – Vol. 3.3.4. – P. 1-28.

155. Wright, P. F. Orthomyxoviruses / P. F. Wright, G. Neumann, Y. Kawaoka // Fields virology. – Philadelphia, 2013. – Vol. 1. – P. 1691-1740.

7. ПРИЛОЖЕНИЯ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по НИР и
мониторингу ФГБУ «ВНИИЗЖ»

И.А. Чвала

« 28 » октября 2019 г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по качеству
ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.К. Старов

« 29 » октября 2019 г.

СТАНДАРТ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

**НАБОР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ
ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА Н9 В РЕАКЦИИ
ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ**

СТО 00495527-0334-2019

Технические условия

Владимир
2019

ОКС 11.220

ОКПД2 21.10.60.196

Ключевые слова: набор, выявление, антитела, грипп птиц, ГП, подтип Н9, реакция торможения гемагглютинации, РТГА, активность, специфичность, растворимость.

Руководитель
разработки:

Заведующий референтной лабораторией
вирусных болезней птиц

Д.Б. Андрейчук

Ответственный
исполнитель:

Ведущий научный сотрудник
референтной лаборатории вирусных
болезней птиц

М.А. Волкова

Исполнители:

Ветврач 1 категории
референтной лаборатории вирусных
болезней птиц

О.С. Осипова

Младший научный сотрудник
референтной лаборатории вирусных
болезней птиц

В.Ю. Сосипаторова

Ведущий научный сотрудник
референтной лаборатории вирусных
болезней птиц

И.А. Чвала





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

Федеральный институт промышленной
собственности (ФИПС) Роспатента
125993, Москва, Бережковская наб., д. 30,
корп. 1, Г-59, ГСП-3
E-mail: fips@rupto.ru

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

СПРАВКА № 113 - деп / 19-3
о депонировании штамма
«A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2»
вируса гриппа птиц
для целей патентной процедуры

Форма депонирования: национальное патентное депонирование.

Авторы штамма: О.С. Осипова, В.Ю. Сосипаторова, Д.А. Алтунин, А.В. Андриясов,
Н.Г. Зиняков, П.Б. Акшалова, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала.

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

Вирус был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2018 г. из патологического материала кур,
поступившего из ОАО «Птицефабрика Надеждинская» Приморского края РФ.

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

Штамм относится к отряду Articulavirales, семейству Orthomyxoviridae, роду
Alphainfluenzavirus, виду Influenza A virus.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Регистрационный номер: № 113 - деп / 19-3 - КШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Местом хранения штамма определена Коллекция штаммов микроорганизмов
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») по адресу:
600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрьевец.

Дата депонирования штамма: 10 апреля 2019 г.

Зам. директора ФГБУ «ВНИИЗЖ»
по качеству

Руководитель Коллекции штаммов
микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.К. Старов

С.А. Похвальный



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

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л.Б.



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 FAO 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 № 295 - деп / 20-83
о депонировании штамма
«А / chicken / Zabaikal / 2137 / 2019 H9N2»
вируса гриппа птиц

Форма депонирования: «Хранение».

Авторы штамма: О.С. Осипова, В.Ю. Сосипаторова, Д.А. Алтунин, А.В. Андриясов, Н.Г. Зиняков, П.Б. Акшалова, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала.

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 от вл. В.П. Некипелова г. Бaley Бaleyского района Забайкальского края РФ.

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

Штамм относится к отряду *Articulavirales*, семейству *Orthomyxoviridae*, роду *Alphainfluenzavirus*, виду *Influenza A virus*, серотипу H9N2.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Регистрационный номер: № 295 - деп / 20-83 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

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

Дата депонирования штамма: 26 ноября 2020 г.

Заместитель директора по НИР и качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ»

А.Е. Метлин
2020г.

Руководитель Государственной коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.А. Похвальный
// 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 Юрьевец,
т.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77
e-mail: mail@arriah.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527170001,
ОГРН: 1023301283720,
ИНН/КПП: 3327100048/332701001

Федеральный институт промышленной
собственности (ФИПС) Роспатента

125993, Москва, Бережковская наб., д. 30,
корп. 1, Г-59, ГСП-3

E-mail: fips@rupto.ru

№ _____

**СПРАВКА № 333 - деп / 20-121
о депонировании штамма
«A / chicken / Chelyabinsk / 314-1 / 2020
H9N2» вируса гриппа птиц
для целей патентной процедуры**

Форма депонирования: «Национальное патентное депонирование».

Авторы штамма: О.С. Осипова, В.Ю. Сосипаторова, П.Д. Жестков, А.В. Андриясов,
Н.Г. Зиняков, 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 ПАО «Птицефабрика Челябинская» г. Копейск
Челябинской обл. РФ.

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

Штамм относится к отряду *Articulavirales*, семейству *Orthomyxoviridae*, роду
Alphainfluenzavirus, виду *Influenza A virus*, серотипу H9N2.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Регистрационный номер: № 333 - деп / 20-121 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

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

Дата депонирования штамма: 11 декабря 2020 г.

Заместитель директора по НИР и качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ»

А.Е. Метлин
«27» 09 2021г.

Руководитель Государственной коллекции штаммов
микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.А. Похвальный
«27» 04 2021г.





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 № 294 - деп / 20-82
о депонировании штамма
«А / chicken / Tadjikistan / 2379 / 2018
H9N2» вируса гриппа птиц

Форма депонирования: «Хранение».

Авторы штамма: О.С. Осипова, В.Ю. Сосипаторова, Д.А. Алтунин, А.В. Андриясов, Н.Г. Зиняков, П.Б. Акпалова, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала.

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

Вирус был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2018г. из патологического материала, полученного от кур и поступившего из птицефабрики Мабрук Республики Таджикистан.

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

Штамм относится к отряду *Articulavirales*, семейству *Orthomyxoviridae*, роду *Alphainfluenzavirus*, виду *Influenza A virus*, серотипу H9N2.

Штамм предложен в качестве диагностического.

Регистрационный номер: № 294 - деп / 20-82 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

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

Дата депонирования штамма: 26 ноября 2020 г.

Заместитель директора по НИР и качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ»

А.Е. Метлин
2020г.

Руководитель Государственной коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.А. Похвальный
« 26 » 11 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

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТЛОВА Л.Б.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2736786

Штамм "A/chicken/Primorsk/419/2018 H9N2" вируса гриппа птиц рода Alphainfluenzavirus вида Influenza A virus подтипа H9 для контроля антигенной и иммуногенной активности вакцин против гриппа птиц и для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики гриппа птиц типа A подтипа H9

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ") (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2020115194

Приоритет изобретения 16 апреля 2020 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 20 ноября 2020 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 16 апреля 2040 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлеев Г.П. Ивлеев



КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫМ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Д.Б.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2767359

Штамм "A/chicken/Chelyabinsk/314-1/2020 H9N2" вируса гриппа птиц рода Alphainfluenzavirus вида Influenza A virus подтипа H9 для контроля антигенной и иммуногенной активности вакцин против гриппа птиц и для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики гриппа птиц типа А подтипа H9

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ") (RU)*

Авторы: *Осипова Ольга Сергеевна (RU), Сосипаторова Виктория Юрьевна (RU), Зиняков Николай Геннадьевич (RU), Волкова Марина Алексеевна (RU), Андрейчук Дмитрий Борисович (RU), Чвала Илья Александрович (RU)*

Заявка № 2021113015

Приоритет изобретения 04 мая 2021 г.

Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 17 марта 2022 г.

Срок действия исключительного права на изобретение истекает 04 мая 2041 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



КОПИЯ ВЕРНА

УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2738900

**Диагностический набор для выявления антител к вирусу
гриппа птиц подтипа Н9 в реакции торможения
гемагглютинации**

Патентообладатель: **Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Федеральный центр охраны здоровья
животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ") (RU)**

Авторы: **Осипова Ольга Сергеевна (RU), Сосипаторова
Виктория Юрьевна (RU), Волкова Марина Алексеевна (RU),
Чвала Ирина Александровна (RU), Андрейчук Дмитрий
Борисович (RU), Чвала Илья Александрович (RU)**

Заявка № 2020116057

Приоритет изобретения 27 апреля 2020 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 18 декабря 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 27 апреля 2040 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Исхиев



КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.