

На правах рукописи

Гусева Нелли Андреевна

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

1.5.10 «Вирусология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владимир – 2026

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

Научный руководитель	Чвала Илья Александрович , кандидат ветеринарных наук
Официальные оппоненты	Гамбарян Александра Сергеевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии вирусов Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита); Лага Вита Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры вирусологии и микробиологии имени академика В.Н. Сюрина Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина»
Ведущая организация	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение " Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины "

Защита диссертации состоится « 16 » июня 2026 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета 36.1.002.01, созданного на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») по адресу: 600901, г.Владимир, мкр. Юрьево, ул. Гвардейская 6, тел. 8(4922) 52-99-62

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ». Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.arriah.ru

Автореферат разослан _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность работы. Ньюкаслская болезнь (НБ) ежегодно регистрируется во всем мире у домашних птиц, в том числе у кур, гусей, уток, индеек и т.д. Заболевание наносит большой ущерб промышленному и домашнему птицеводству во всем мире и внесено в список нотифицируемых заболеваний Всемирной организации здоровья животных (ВОЗЖ). НБ вызывают велогенные штаммы *Orthoavulavirus javaense* (*Avian paramyxovirus 1*), прежнее название *Avian orthoavulavirus 1*. *Avian paramyxovirus 1* (APMV1) относится к семейству *Paramyxoviridae* подсемейству *Avulavirinae* роду *Orthoavulavirus* и обладает высоким генетическим разнообразием штаммов и изолятов (ICTV, 2024). В настоящее время все штаммы и изоляты APMV1 делят на два класса – класс I и класс II. Класс I включает в себя единственный генотип 1, который подразделяется на субгенотипы 1.1.1, 1.1.2 и 1.2. Класс II состоит по крайней мере из 20 различных генотипов, часть из которых делятся на субгенотипы (Dimitrov K.M. et al., 2019).

Геном APMV1 представляет собой одноцепочечную молекулу (-)РНК длиной около 15 тыс. нуклеотидов, кодирующую шесть структурных белков – нуклеопротеин (NP), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), белок слияния (F), гемагглютинин-нейраминидазу (HN) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L). Основной детерминантой вирулентности изолятов APMV1 является аминокислотный состав сайта расщепления белка слияния F (Mayahi V. et al., 2017; Xue J. et al., 2017; Abozaid K.G. et al., 2022). Вирулентные изоляты характеризуются наличием нескольких (трех и более) основных аминокислот на С-конце белка F2 в позициях 113-116 и фенилаланина на N-конце белка F1 в позиции 117 сайта протеолитического расщепления белка слияния – 112-R/G/K R Q/K K/R R^F-117. Авирулентные изоляты содержат в сайте расщепления всего 2 основные аминокислоты и лейцин в положении 117 – 112-G R Q G R^L-117 (Sabouri F. et al., 2018).

За последние 20 лет наибольшую угрозу для стран Европы, Азии и Африки представляют вспышки НБ, вызванные APMV1 генотипа VII класса II.

На территории России в разные периоды времени выявляли вирусы ньюкалской болезни (ВНБ) субгенотипов VII.1.1 (2000-2010 гг) (Dimitrov K.M. et

al., 2016) и VII.2 (2013 г, 2016-2017 гг) (Пчелкина И.П. и др., 2014; Шагурина Е.В. и др., 2017).

С 2019 года все вспышки НБ на территории Российской Федерации были вызваны вирусами субгенотипа VII.1.1 (субгенотипа VII-L, по классификации Diel D.G. et al. 2012 г, предложенного Esmaelizad M. et al.). Первые данные о вирусах субгенотипа VII-L были предоставлены исследователями из Ирана в 2017 году. В своем исследовании авторы указали на сходство и филогенетическую близость с вирусами субгенотипа VII-d (Molouki A. et al., 2019; Makki F. et al., 2021). В следующих исследованиях те же авторы показали распространение вирусов субгенотипа VII-L практически по всем провинциям Ирана (Mayahi V. et al., 2017; Molouki A. et al., 2021). Эти данные свидетельствуют о высоком панзоотическом потенциале вирусов данной группы, которые также могут представлять угрозу для домашнего и промышленного птицеводства на территории Российской Федерации (РФ) и сопредельных государств.

1.2 Степень разработанности проблемы. Широкое разнообразие штаммов и изолятов АРМV1 объясняет важность изучения молекулярно-генетических свойств вновь выявленных вирусов, в первую очередь для определения их вирулентности. Расщепление белка слияния на субъединицы F1 и F2 необходимо для инфекционного процесса, что было подтверждено многими исследователями (Nagai Y. et al., 1976; Nagai Y. et al., 1977; Garten W. et al., 1980; Choppin P.W. et al., 1980; Rott R. et al., 1988; Glickman R.L. et al., 1988; Ogasawara T. et al., 1992, Shin-Hee Kim et al., 2016; Suarez D.L. et al., 2020; Henry M Kariithi et al., 2023).

Определение нуклеотидной последовательности гена слияния F лежит в основе большинства научных исследований, связанных с АРМV1. Так, ряд исследователей изучали эволюционную динамику, молекулярную эпидемиологию и генетическое разнообразие АРМV1, основываясь на полных или частичных последовательностях гена слияния F (Miller P. et al., 2009; Miller P. et al., 2010; Ramey A.M. et al., 2013; Dimitrov et al., 2016; Hicks J.T. et al., 2019)

Также, в 2012 году группой авторов была предложена унифицированная и объективная система классификации АРМV1, основанная на полной

нуклеотидной последовательности гена слияния F (Diel D.G. et al., 2012). В 2019 году для повышения надежности определения принадлежности выявленных вирусов к той или иной генетической группе данная классификация была доработана и усовершенствована экспертной группой ученых из разных стран мира (Dimitrov K.M. et al., 2019).

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

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Определить основные генетические группы ARMV1, циркулирующего на территории РФ в 2019-2023 гг.;
- Определить полные нуклеотидные последовательности генов F и HN, а также нуклеотидные последовательности полных геномов ряда изолятов ВНБ, выявленных в разных регионах страны в 2019-2023 гг.;
- Провести филогенетический и эволюционный анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей изолятов ВНБ, выявленных в 2019-2023 гг.;
- Разработать методические рекомендации по выявлению РНК ARMV1 генотипа VII с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени в пробах биологического материала птиц;
- Разработать методические рекомендации по определению первичной структуры генов F и HN изолятов вируса болезни Ньюкасла генотипа VI с помощью ОТ-ПЦР и секвенирования;
- Провести депонирование во Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» выделенных изолятов ВНБ, выявленных в разных регионах РФ, как стандартных образцов для лабораторной диагностики.

1.4 Научная новизна работы. В результате проведенных исследований были определены основные генетические группы изолятов ARMV1, циркулирующих на территории РФ: вирулентные вирусы генотипа VII, выявляемые у домашних птиц в личных подсобных хозяйствах граждан;

вирулентные изоляты генотипа VI и его производных, циркулирующие в популяциях голубей; авирулентные вирусы генотипа I класса II, выявляемые в основном у диких водоплавающих птиц; лентогенные и реже мезогенные вакцинные штаммы генотипов I, II и III.

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

1.5 Теоретическая и практическая значимость проведенных исследований. Полученные штаммы ВНБ могут быть использованы в качестве стандартных образцов при разработке и совершенствовании средств и методов лабораторной диагностики, а также при контроле ветеринарных препаратов. Получен патент на «Штамм «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни птиц для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц.

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

В ходе выполнения диссертации разработаны, одобрены и утверждены Ученым советом ФГБУ «ВНИИЗЖ»: «Методические рекомендации по

выявлению РНК изолятов *Avian orthoavulavirus 1* генотипа VII и его производных с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени»; «Методические рекомендации по определению первичной структуры генов F и HN изолятов вируса ньюкаслской болезни генотипа VI с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования»; «Методические рекомендации по определению последовательности ДНК с помощью реакции секвенирования на генетическом анализаторе НАНОФОР-05».

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

1.7 Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты исследования проб биологического материала от птиц, отобранных с целью выявления РНК АPMV1 на территории РФ в 2019-2023 гг.;
2. Филогенетический анализ и молекулярно-генетические свойства изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1, выявленных в регионах РФ в 2019-2023 гг.;
3. Эволюционный анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1, выявленных в регионах РФ в 2019-2023 гг.

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

По материалам диссертации опубликовано восемь научных работ, из которых три статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, две в международных журналах, цитируемых в системах Web of Science и Scopus, и патент РФ на изобретение.

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

1.10 Структура и объем работы. Диссертация изложена на 120 страницах компьютерного текста, содержит разделы: обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение. Диссертация содержит 14 приложений, 23 таблицы и 8 рисунков. Список использованной литературы включает 176 источников, из них 160 иностранных.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

В работе использовали следующие материалы и методы.

Пробы. Образцы биологического материала птиц, отобранные специалистами ветеринарных служб на птицефабриках и в личных подсобных хозяйствах (ЛПХ) граждан у домашних, а также у диких птиц.

Вирусы. 40 изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1 (VII-L), выделенных в 9-11-суточных куриных эмбрионах, свободных от специфических патогенов (СПФ-КЭ).

Оборудование и аппаратура. Программируемые амплификаторы для проведения ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ; центрифуги настольные (высокоскоростная

и низкоскоростная); вакуумный отсасыватель; УФ-трансиллюминатор; спектрофотометр; установка для горизонтального электрофореза; электронные весы; автоматические дозаторы (от 1 до 1000 мкл); автоматический секвенатор (ABI Prism 3130xl); генетический анализатор (Illumina).

Растворы и реактивы. Набор для выделения РНК/ДНК; обратная транскриптаза «Thermo Scientific Maxima H Minus»; ингибитор РНКаз «RiboLock»; Taq ДНК-полимераза GoTaq Flexi; SynTaq ДНК-полимераза; MMLV-ревертаза; ПЦР-Буфер-Б 10х и 5х; смесь дНТФ; раствор $MgCl_2$; набор реагентов для очистки фрагментов ДНК; буфер TBE; агароза легкоплавкая; набор для секвенирования BigDye Terminator Cycle Sequencing kit; олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды; вода деионизованная (бидистиллированная); фосфатно-буферный раствор (ФБР) (рН=7,2-7,4).

Выделение вируса. Проводили в 9-11-суточных СПФ-КЭ, согласно рекомендации ВОЗЖ (WOAH Terrestrial Manual 2021). От эмбрионов, погибших после 24 ч инкубации и более, отбирали экстраэмбриональную жидкость (ЭЭЖ) для дальнейшей работы.

Выделение РНК. Суммарную РНК выделяли с помощью набора «РИБО-сорб», согласно инструкции производителя. Для исследований использовали 10-20% суспензию внутренних органов птиц, трахеальные и клоакальные мазки от птиц и ЭЭЖ СПФ-КЭ.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием набора реактивов «Maxima H Minus» и ингибитора РНКаз «RiboLock» в программируемом амплификаторе. ПЦР проводили с использованием фермента Taq-ДНК-полимеразы, буфера 5х для ПЦР, раствора $MgCl_2$, воды, свободной от РНК-аз, раствора дНТФ, растворов олигонуклеотидных праймеров в программируемом амплификаторе. Результаты ПЦР учитывали путем анализа продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле. ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили в одну стадию с использованием SynTaq ДНК-полимеразы, MMLV-ревертазы, ПЦР-Буфера-Б 10х, смеси дНТФ, раствора

MgCl₂, воды, свободной от РНКаз, олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда в программируемом амплификаторе.

Нуклеотидное секвенирование по Сэнгеру и полногеномное секвенирование. Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130xl с использованием готовых наборов различных модификаций производства Applied Biosystems. Полногеномное секвенирование осуществляли с помощью генетического анализатора MiSeq (Illumina), согласно инструкции производителя. Для приготовления библиотек использовали коммерческие наборы Nextera XT(Illumina), Nextera XT Index Kit (Illumina).

Филогенетический и эволюционный анализ. Выравнивание и редактирование полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программного обеспечения BioEdit (версия 7.2.). Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA X (10.2.6). Для определения скорости накопления точечных мутаций и времени наступления основных филогенетических событий использовали байесовский анализ и программу BEAST (v.1.10.4). Были использованы модели нуклеотидных замен GTR и НКУ и гамма-распределение скоростей замен (5 категорий), эмпирическая частота нуклеотидов, разбиение кодона на позиции 1, 2 и 3, строгий и некоррелированный мягкий варианты молекулярных часов. Для расчета оценок параметров использовали программу Tracer 1.7.2. (Rambaut et al., 2018).

2.2 Результаты собственных исследований

Анализ свойств изолятов *APMV1*, выявленных на территории РФ в 2019-2023 гг. В 2019-2023 гг. 29091 проба биологического материал птиц (19545 проб от домашней птицы, 9546 проб от дикой птицы) из 76 регионов РФ были исследованы методом ОТ-ПЦР-РВ на наличие генома *APMV1*. Геном *APMV1* был выявлен в 386 пробах. Регионы Российской Федерации, где был обнаружен *APMV1*, показаны на рисунке 1.



Рисунок 1 - Регионы РФ, в которых был выявлен *ARMV1* в 2019-2023 гг.

В 35 регионах РФ из 76 обследованных *ARMV1* не выявляли на протяжении 2019-2023 гг. В то же время в некоторых регионах (Республика Татарстан, Владимирская и Курская области) случаи выявления различных генетических групп *ARMV1* происходили неоднократно в течение 5 лет.

Вакцинные штаммы субгенотипов I.1.1 и I.1.2.1 были выявлены в пробах от кур и других домашних птиц в Иркутской, Самарской, Кемеровской, Курской, Ленинградской, Кировской, Тюменской, Томской, Костромской, Челябинской, Архангельской, Новгородской и Рязанской областях, в Республиках Татарстан и Коми, в Красноярском крае и Ханты-Мансийском автономном округе в 2019-2023 гг. (156 проб).

Также в 2023 г в пробах от сизых голубей из Республики Мордовия был выявлен вакцинный штамм субгенотипа I.1.1 (9 проб). Вакцинные штаммы генотипа II выявлены в пробах от кур в Владимирской, Вологодской, Тюменской, Волгоградской, Псковской, Калининградской, Курской, Московской, Иркутской и Воронежской областях, в Республиках Татарстан, Коми и Удмуртия и Красноярском крае, а также в пробе от индейки в Омской

области в 2019-2023 гг. (51 проба). Вакцинный штамм генотипа III был выделен в пробе от курицы в Ставропольском крае в 2020 году (1 проба).

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

Авирулентные вирусы генотипа I.2 были выявлены в пробах от диких водоплавающих птиц и фазана из Амурской и Владимирской областей в 2020-2022 гг. и от диких уток из Ямало-Ненецкого автономного округа и Республики Хакасия в 2022 году (23 пробы). Сайт расщепления вирусов генотипа I.2 имел структуру 112-GKQGR^L-117, что характерно для авирулентных форм вируса.

Собранные данные свидетельствуют о широком распространении в Российской Федерации вирулентного субгенотипа VII.1.1 в период 2019-2023 гг. Вирусы субгенотипа VII.1.1 были выявлены в ЛПХ граждан в Краснодарском, Ставропольском, Приморском, Хабаровском и Забайкальском краях, Республиках Чечня, Ингушетия, Башкортостан и Марий Эл, Саратовской, Самарской, Омской, Иркутской, Курской, Владимирской и Нижегородской областях и Ханты-Мансийском АО (141 проба). Сайт расщепления вирусов субгенотипа VII.1.1 имел структуру 112-RRQKR^F-117.

Таким образом, можно выделить основные генетические группы *APMV1*, циркулирующие на территории РФ:

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

Филогенетическая принадлежность выявленных изолятов *APMV1* представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Филогенетическая принадлежность изолятов и вакцинных штаммов *APMV1*, выявленных в РФ в 2019-2023 гг.

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

Выделение вируса на СПФ-КЭ. В 2019-2023 гг. методом вирусовыделения в 10-суточных СПФ-КЭ были исследованы 386 проб биологического материала от птиц, содержащих геном *APMV1* (субгенотип VII.1.1 (VII-L)) из 41 региона РФ. В ходе работы было выделено 40 изолятов *APMV1*.

Определение полных нуклеотидных последовательностей генов F и HN и нуклеотидных последовательностей полных геномов изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1, выявленных в регионах РФ в 2019-2023 гг. Вирусы субгенотипа VII.1.1 в 2019-2023 гг. выявляли в пробах от домашних птиц из личных подсобных хозяйств граждан. Стоит отметить, что большая часть вспышек НБ, вызванных вирусами данного субгенотипа, приходится на осенне-зимний период (более 60 %). Были определены полные нуклеотидные последовательности генов F и HN для 26 изолятов и полногеномные последовательности для 14 изолятов (таблица 2).

В ходе исследования был проведен анализ полученных полногеномных последовательностей. Длина последовательности для каждого изолята составила 15192 нуклеотида. Сравнение полученных последовательностей с последовательностью изолята, выявленного в Иране в 2011 г. (MF417546.1), показало сходство 96,59-98,06%.

Таблица 2 – Информация об изолятах ВНБ субгенотипа VII.1.1, выявленных на территории РФ в 2019-2023 гг.

№	Название изолята	Вид птицы	Дата исследования	Рез-ты секвенир.
1	NDV/Ck/Rus/Krasnodar/207/19	Курица	01.02.19	Полный геном
2	NDV/Ck/Rus/Chechnya/819/19	Курица	12.04.19	Полный геном
3	NDV/Ck/Rus/Stavropol/923/19	Курица	23.04.19	Полный геном
4	NDV/Ck/Rus/Primorsk/1134/19	Курица	22.05.19	F, HN
5	NDV/Ck/Rus/Saratov/2017/19	Курица	27.08.19	F, HN
6	NDV/Ck/Rus/Zabaikalsk/2346/19	Курица	04.10.19	Полный геном
7	NDV/Ck/Rus/Omsk/2366/19	Курица	10.10.19	Полный геном
8	NDV/poultry/Rus/Kursk/2819/19	Птица дом.	20.11.19	Полный геном
9	NDV/Ck/Rus/Primorsk/3087/19	Курица	17.12.19	Полный геном
10	NDV/Ck/Rus/Kursk/68/20	Курица	21.01.20	F, HN
11	NDV/Ck/Rus/Kursk/142/20	Курица	05.02.20	F, HN
12	NDV/Ck/Rus/Vladimir/709/20	Курица	07.05.20	F, HN
13	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1464/20	Курица	24.09.20	F, HN
14	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1474/20	Курица	15.09.20	F, HN
15	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1553/20	Курица	23.09.20	F, HN
16	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1715/20	Курица	19.10.20	F, HN
17	NDV/Ck/Rus/Ingushetia/1750/20	Курица	15.10.20	Полный геном
18	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1931/20	Курица	16.11.20	F, HN
19	NDV/Ck/Rus/Vladimir/2125/20	Курица	02.12.20	F, HN
20	NDV/Ck/Rus/Chechny/2191/20	Курица	11.12.20	F, HN
21	NDV/Ck/Rus/N.Novgorod/667/21	Курица	18.05.21	F, HN
22	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1035/21	Курица	20.07.21	F, HN
23	NDV/Ck/Rus/Khanty-Mansi/1240/21	Курица	23.08.21	Полный геном
24	NDV/Ck/Rus/Primorsk/1472/21	Курица	27.09.21	F, HN
25	NDV/poultry/Rus/Vladimir/2271/21	Птица дом.	29.12.21	Полный геном
26	NDV/Ck/Rus/Vladimir/1114/22	Курица	09.06.22	F, HN
27	NDV/poultry/Rus/Saratov/2403/22	Птица дом.	29.10.22	F, HN
28	NDV/Ck/Rus/Samara/2453/22	Курица	02.11.22	F, HN
29	NDV/poultry/Rus/Bashkortostan/2776/22	Птица дом.	06.12.22	Полный геном
30	NDV/quail/Rus/Mari El/128/23	Перепел	26.01.23	F, HN
31	NDV/Ck/Rus/Samara/761/23	Курица	13.04.23	Полный геном
32	NDV/Ck/Rus/N.Novgorod/1230/23	Курица	29.05.23	F, HN
33	NDV/Ck/Rus/Irkutsk/1317/23	Курица	06.06.23	Полный геном
34	NDV/Ck/Rus/Vladimir/2042/23	Курица	18.08.23	F, HN
35	NDV/Ck/Mari El/2090/23	Курица	24.08.23	F, HN
36	NDV/Ck/Rus/Khanty-Mansi/2285/23	Курица	13.09.23	F, HN
37	NDV/Ck/Rus/Vladimir/2501/23	Курица	03.10.23	F, HN
38	NDV/Ck/Rus/Vladimir/2546/23	Курица	06.10.23	Полный геном
39	NDV/Ck/Rus/Mari El/3061/23	Курица	23.11.23	F, HN
40	NDV/Ck/ Rus/Khabarovsk/3162/23	Курица	04.12.23	F, HN

При сравнении отдельных генов/белков российских изолятов ВНБ с иранским было установлено, что ген/белок Р является наиболее варибельным.

Отличия гена Р для разных изолятов составили 3,5-4,9%, белка Р – 3,6-6,1%. В то же время остальные гены/белки имеют примерно близкие значения нуклеотидных отличий, при заметных различиях изменчивости по аминокислотам (рисунки 2 и 3).

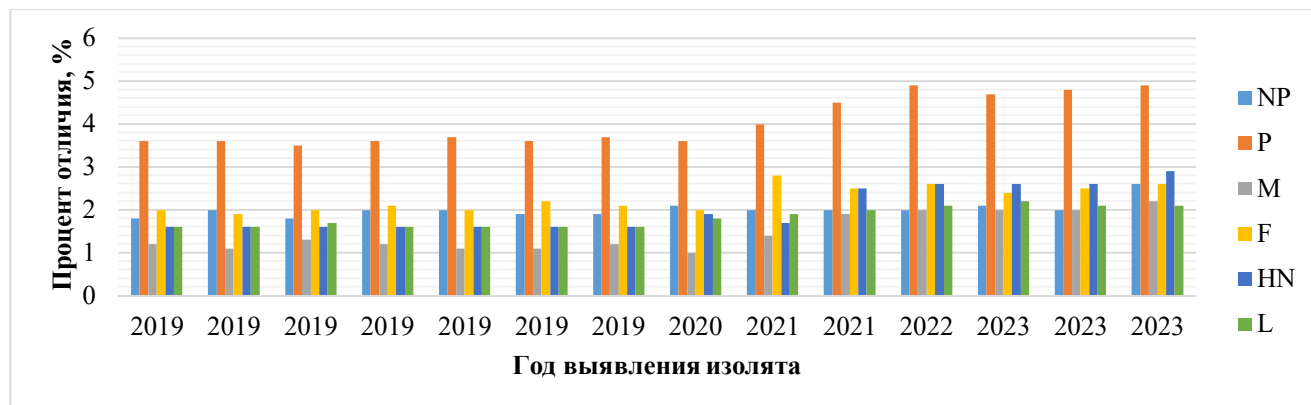


Рисунок 2 - Отличия генов российских изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1 (период выявления 2019-2023 гг.) от иранского изолята (год обнаружения - 2011 г.)

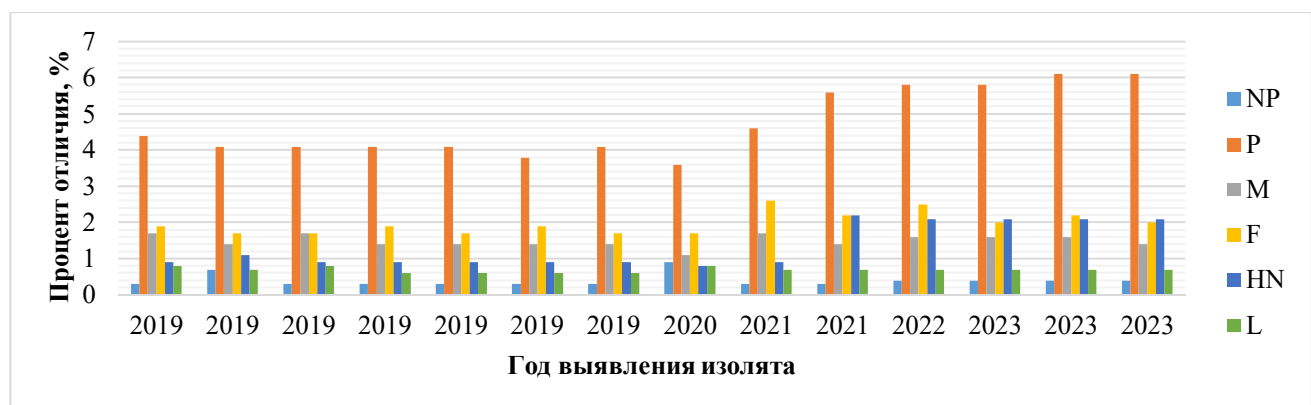


Рисунок 3. Отличия белков российских изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1 (период выявления 2019-2023 гг.) от иранского изолята (год обнаружения - 2011 г.)

Филогенетический анализ изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1, выявленных в РФ в 2019-2023 гг. При исследовании проб были получены полные нуклеотидные последовательности генов F и HN, которые позволили провести сравнительный анализ российских изолятов с вирусами, последовательности которых представлены в базе данных GenBank (ncbi.nlm.nih.gov).

Поиск обладающих наибольшим сходством последовательностей в программе BLAST показал, что наиболее близкой к российским изолятам 2019-

2023 гг. является группа изолятов субгенотипа VII-L из Ирана, выявленных в 2011-2015 гг. (сходство до 97,95%). Также высокий уровень сходства (96,33-97,05%) наблюдается с изолятами данного генотипа, выявленными в Иране в 2017-2020 гг. и с изолятами субгенотипа VII-d, выявленными в Ираке в 2005 г. и 2008 г. (Рисунки 4 и 5).

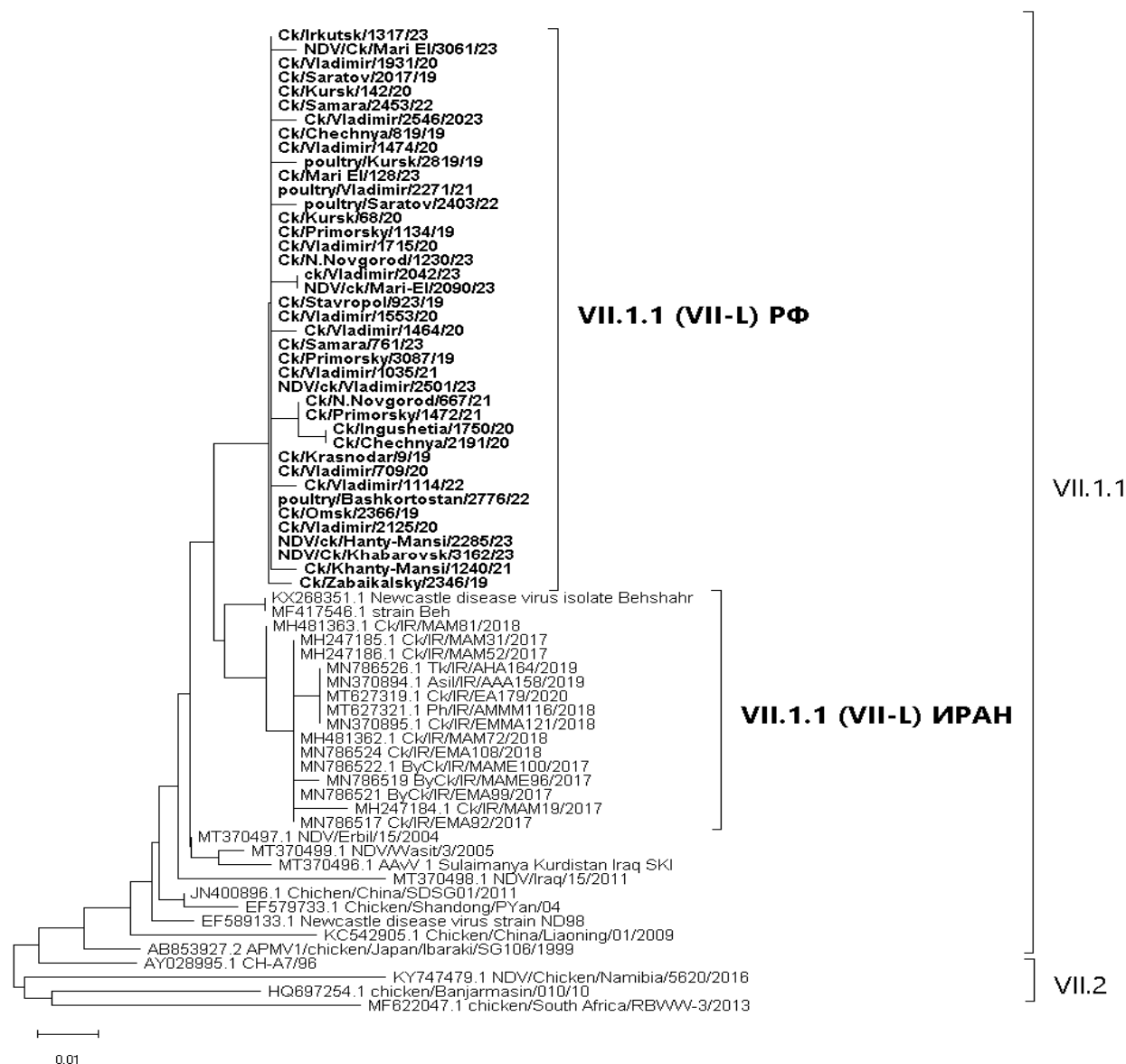


Рисунок 4. Филогенетическое древо изолятов ВНБ генетической группы VII-L (субгенотип VII.1.1) (нуклеотиды 1-1661 ОРС гена F)

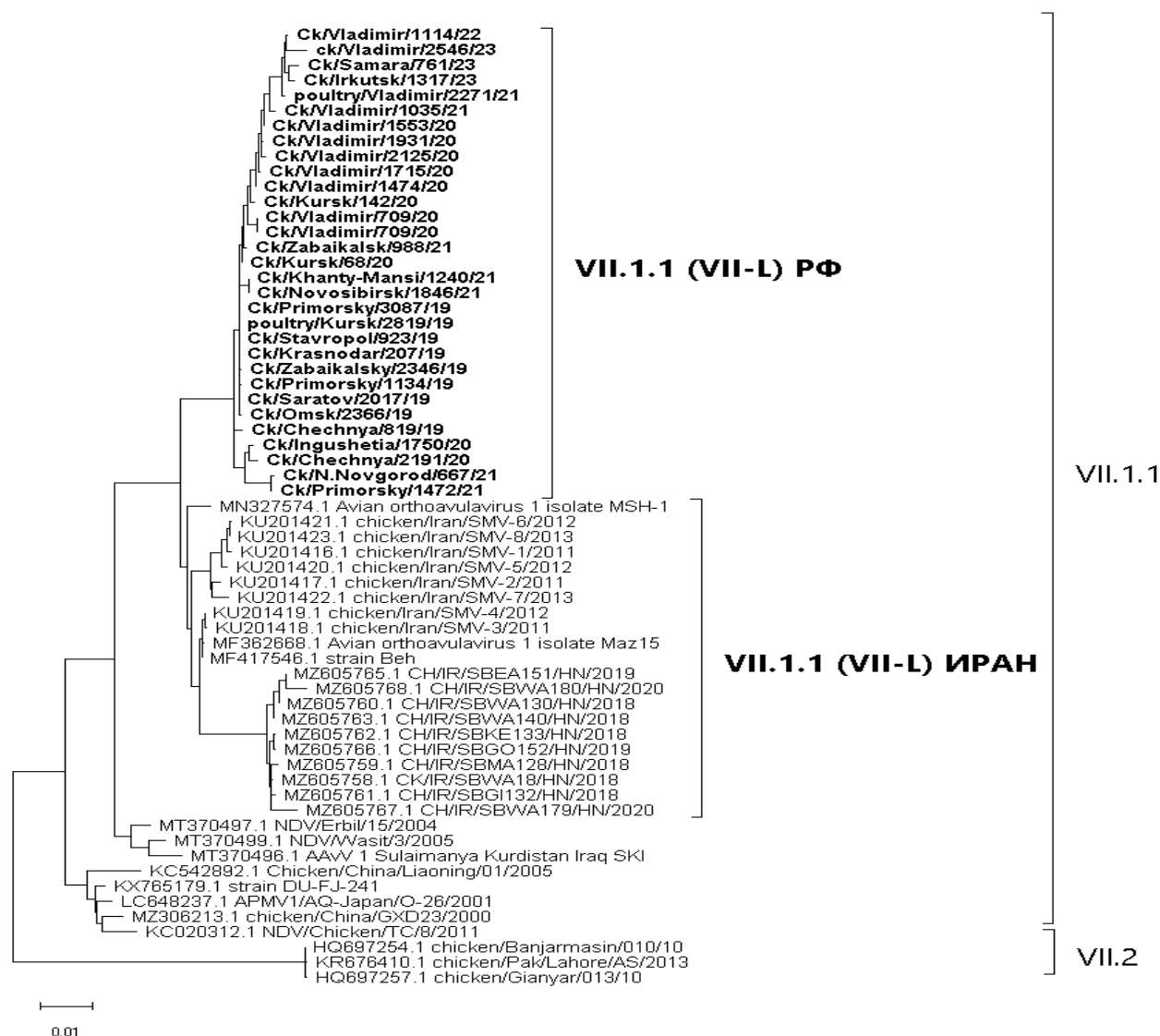


Рисунок 5. Филогенетическое дерево изолятов ВНБ генетической группы VII-L (субгенотип VII.1.1) (нуклеотиды 1-1715 ОРС гена HN)

Однако изоляты субгенотипа VII.1.1, выявленные в РФ, обладают рядом специфических нуклеотидных замен, которые определяют их в обособленную генетическую линию в пределах группы VII-L (Таблица 3).

Так, на открытой рамке считывания гена F имеются общие для всех изолятов из РФ замены: всего 25 нуклеотидных замен. Большая часть этих замен являются синонимичными транзициями (17 замен), но также присутствуют синонимичные трансверсии (3 замены). В то же время 5 замен из 25 внутри массива российских изолятов являются значимыми.

Таблица 3 – Специфические нуклеотидные замены последовательностей генов F и HN изолятов субгенотипа VII.1.1, выявленных на территории РФ в 2019-2023 гг.

Ген	Тип нуклеотидных замен	
	Трансверсия	Транзиция
F	114A->T, 564C->A* , 1008A->C, 1131C->G, 1217C->A* , 1455C->A*	152A->G* , 210C->T, 294C->T, 348T->C, 441T->C, 474T->C, 480A->G, 504C->T, 651G->A, 748T->C, 810T->C, 834A->G, 906T->C, 948A->G, 1093C->T, 1281A->G, 1401T->C, 1490G->A* , 1497T->C
HN	1453A->C, 1490C->A*	30G->A, 82A->G* , 103A->G* , 456T->C, 470A->G* , 507A->G, 510C->T, 552C->T, 615C->T, 618G->A, 861C->T, 903G->A, 1026C->T, 1066A->G* , 1161A->G, 1278A->G, 1450C->T, 1470G->A, 1503C->T, 1518C->T, 1530T->C, 1623T->C, 1629T->C, 1684C->T

*-значимая нуклеотидная замена

В результате анализа нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания гена HN также были выявлены общие для всех изолятов из РФ замены: всего 26 нуклеотидных замен. Большая часть этих замен, как и в случае с F геном, являются синонимичными транзициями (21 замена). Также можно отметить, что 5 замен из 26 являются значимыми.

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

Эволюционный анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей изолятов ВНБ, выявленных в РФ в 2019-2023 гг. В ходе исследования был проведен байесовский анализ полученных последовательностей гена F в программе BEAST с целью определения скорости накопления замен и времени наступления основных филогенетических событий.

Скорость накопления точечных мутаций в группе российских изолятов субгенотипа VII.1.1 (n=40) за пять лет (2019-2023 гг.) была определена в программе BEAST для моделей нуклеотидных замен General time reversible (GTR) и Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) по строгой и некоррелированной мягкой модели молекулярных часов. Полученные значения скорости накопления нуклеотидных замен практически не зависели от выбранной модели нуклеотидных замен и заметно менялись в зависимости от принятой модели молекулярных часов (0,0018 и 0,002 сайт⁻¹год⁻¹), что наблюдалось и другими авторами для ВНБ (Miller et al., 2009; Molouki et al., 2019) (таблица 4).

Таблица 4 – Скорость накопления замен и даты основных филогенетических событий для российских изолятов субгенотипа VII.1.1

Статистики оценок	Примененные модели и оценки параметров			
	GTR		HKY	
	Строгая модель	Нестрогая модель	Строгая модель	Нестрогая модель
	<i>Скорость накопления замен на сайт в год для изолятов из РФ</i>			
<i>Среднее значение</i>	1.8x10⁻³	2.0x10⁻³	1.8x10⁻³	2.0x10⁻³
Станд. откл. ср. знач.	3.4310x10 ⁻⁴	5.47x10 ⁻⁴	3.47x10 ⁻⁴	5.50x10 ⁻⁴
	<i>Дата корневого узла дерева для группы иранских и российских изолятов</i>			
<i>Среднее значение</i>	2008.9373	2008.9651	2007.8821	2008.5288
Станд. откл. ср. знач.	1.5625	1.5531	2.935	2.2313
	<i>Дата ближайшего общего предка группы российских изолятов</i>			
<i>Среднее значение</i>	2016.7133	2016.739	2015.7992	2016.4382
Станд. откл. ср. знач.	0.8278	0.8222	1.6926	1.1471

Интересно отметить, что для нашего набора данных датировка корневого узла дерева показала для разных моделей значения в среднем 2008-2009 гг., что ранее первых опубликованных изолятов из Ирана, относящихся к 2010 г. Это свидетельствует о раннем отделении будущей «российской» ветви субгенотипа VII.1.1. В то же время дата ближайшего общего предка группы российских изолятов (2016-2017) довольно близка с датой выявления самого раннего из них (01.2019), что наряду с филогенетическими данными свидетельствует о практически монофилетическом происхождении группы.

Разработка метода ОТ-ПЦР-РВ для выявления РНК *APMV1* генотипа VII и его производных. Разработка метода ОТ-ПЦР-РВ для выявления РНК *APMV1* генотипа VII и его производных включала в себя выбор системы праймеров и зонда, обеспечивающих высокую специфичность, эффективность, чувствительность и воспроизводимость реакции.

Выбор праймеров и зонда. В результате проведенной работы были выбраны и синтезированы 6 праймеров и 6 зондов, фланкирующих разные участки гена L, для последующего их тестирования в ОТ-ПЦР-РВ с целью определения наиболее специфичной и чувствительной системы (таблица 5).

Таблица 5 – Праймеры и зонды для амплификации фрагмента гена L вирусов *APMV1* генотипа VII в ОТ-ПЦР-РВ

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

В ходе экспериментальных постановок ОТ-ПЦР-РВ с различными комбинациями праймеров и зондов с выбранными изолятами *APMV1* была определена наиболее оптимальная система праймеров и зонд: NDV-VII11681F, NDV-VII11772R, NDV-VII11711PF.

Определение специфичности реакции. Для оценки специфичности выбранной системы проводили ОТ-ПЦР-РВ, используя пробы с генетическим материалом *APMV1* генотипа VII и других генотипов, а также пробы, содержащие РНК вирусов гриппа птиц, инфекционной бурсальной болезни и инфекционного бронхита кур. В ходе эксперимента положительные результаты

были получены только в пробах, содержащих РНК *APMV1* генотипа VII и его производных.

Определение эффективности реакции. В ходе данной работы была определена эффективность реакции (E) для разных субгенотипов *APMV1* генотипа VII и его производных. Непосредственно перед выполнением эксперимента готовили ряд десятикратных разведений (10^{-1} - 10^{-7}) выделенной РНК изолятов субгенотипов VII.1.1 (VIIIL), VII.2.1 (VIIi), VII.2 (VIIh), VII.1.1 (VIId), XIII.1.2 (XIIIa, VIIb). Для определения эффективности реакции ставили ОТ-ПЦР-РВ с разведениями 10^{-3} - 10^{-7} . Каждое разведение ставили в трёх повторностях. Значения E составили от 90% до 93% у разных субгенотипов, что является приемлемым для данного метода. Значения m, R^2 , b и E для исследуемых изолятов представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Значения коэффициента детерминации, наклона прямой и эффективности реакции для изолятов *APMV1* генотипа VII и его производных разных субгенотипов

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

Определение аналитической чувствительности и воспроизводимости реакции. Непосредственно перед выполнением эксперимента готовили ряд десятикратных разведений (10^{-1} - 10^{-8}) выделенной суммарной РНК изолятов субгенотипов VII.1.1 (VIIIL), VII.2.1 (VIIi), VII.2 (VIIh), VII.1.1 (VIId), XIII.1.2 (XIIIa, VIIb). Для определения чувствительности реакции ставили ОТ-ПЦР-РВ с разведениями 10^{-3} - 10^{-6} . Каждое разведение исследовали в трёх повторностях. Значение порогового цикла (Ct), выше которого результаты реакции следует

считать отрицательными, установили на уровне 37. Оценку чувствительности для граничного значения порогового цикла ($C_t = 37,00$) в ОТ-ПЦР-РВ проводили с помощью уравнения для стандартной прямой. Как видно из таблицы 7, с помощью данного метода возможно обнаружить РНК вирусов *APMV1* VII генотипа и его производных при значениях инфекционного титра от 1,65 до 3,62 lg ЭИД₅₀/см³. Полученные результаты по аналитической чувствительности сопоставимы с ранее разработанным методом ОТ-ПЦР-РВ с амплификацией фрагмента гена L (Fuller C.M. et.al., 2010) и являются приемлемыми.

Таблица 7 – Значения порогового цикла для изолятов *APMV1* VII генотипа и его производных в ОТ-ПЦР-РВ и граничные значения чувствительности

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

Воспроизводимость данного метода была подтверждена в ходе постановок ОТ-ПЦР-РВ с десятикратными разведениями (10⁻³-10⁻⁶) изолятов *APMV1* VII генотипа и его производных в трёх повторностях в течение трёх разных дней. Как видно из таблицы 8, средние значения порогового цикла в ОТ-ПЦР-РВ показали высокую воспроизводимость разработанного метода.

Таким образом, в результате проведенной работы была подобрана праймерная система и зонд для выявления РНК генома *APMV1* VII генотипа и его производных в ОТ-ПЦР-РВ. Данный метод характеризуется высокими значениями специфичности, эффективности (от 90% до 93% для разных

субгенотипов), чувствительности (от 1,65 до 3,62 lg ЭИД₅₀/см³ для разных субгенотипов) и воспроизводимости реакции.

Таблица 8 – Значения порогового цикла для изолятов *APMV1* VII генотипа и его производных при трёх постановках ОТ-ПЦР-РВ в разные дни

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

С помощью предложенного метода возможно выявлять РНК *APMV1* VII генотипа и его производных в пробах биологического материала птиц.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3.1. Выводы

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

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

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

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

5. Разработан метод по выявлению РНК ВНБ генотипа VII с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени в пробах биологического материала птиц. Разработанный метод характеризуется высокими значениями специфичности, эффективности (от 90% до 93% для разных субгенотипов), чувствительности (от 1,65 до 3,62 lg ЭИД₅₀/см³ для разных субгенотипов) и воспроизводимости реакции. С помощью предложенного метода возможно выявлять РНК ВНБ VII генотипа и его производных в пробах биологического материала от птиц.

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

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

применения в качестве стандартных образцов при совершенствовании средств и методов лабораторной диагностики инфекции.

3.2 Практические предложения

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

Разработаны и внедрены в лабораторную практику «Методические рекомендации по выявлению РНК изолятов Avian orthoavulavirus 1 генотипа VII и его производных с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени»; «Методические рекомендации по определению первичной структуры генов F и HN изолятов вируса ньюкаслской болезни генотипа VI с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования»; «Методические рекомендации по определению последовательности ДНК с помощью реакции секвенирования на генетическом анализаторе НАНОФОР-05».

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

3.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

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

3. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ, ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Guseva N.A.** Analysis of Avian Orthoavulavirus 1 Detected in the Russian Federation between 2017 and 2021 / N.A. Guseva, S.N. Kolosov, N.G. Zinyakov, A.V. Andriyasov, R. Yin, L.O. Scherbakova, E.V. Ovchinnikova, Z.B. Nikonova, D.B. Andreychuk, A.V. Sprygin, I.A. Chvala, N.V. Moroz // *Vaccines* (Basel). – 2023. – Vol. 11(6) – 1032;
2. **Guseva, N.A.**; Kolosov, S.N.; Zinyakov, N.G.; Kozlov, A.A.; Shcherbakova, L.O.; Chvala, I.A.; Andriyasov, A.V.; Yin, R.; Andreychuk, D.B.;

Chvala, I.A. Subgenotype VII.1.1 Newcastle Disease Virus Evolution and Spread in the Russian Federation in 2019–2023. *Viruses* 2025, 17, 1319. <https://doi.org/10.3390/v17101319>

3. **Гусева Н.А.** Генетическая характеристика изолятов вируса Ньюкаслской болезни, выявленных в Российской Федерации в 2022 году / Н.А. Гусева, С.Н. Колосов, Н.Г. Зиняков, А.В. Андриясов, Е.В. Овчинникова, А.А. Козлов, З.Б. Никонова, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала // Молодые ученые - науке и практике АПК: материалы Международной научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых (г. Витебск, 27-28 апреля 2023 г.) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2023. – С. 57-60;

4. **Гусева Н.А.** Разработка метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления РНК *A04V-1* генотипа VII и его производных / Н.А. Гусева, С.Н. Колосов, А.В. Андриясов, А.А. Козлов, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2022. – Т. 18. – С. 686-699;

5. **Гусева Н.А.** Генетический анализ изолятов вируса ньюкаслской болезни генотипа VI, выявленных в РФ в 2018-2020 гг / Н.А. Гусева, С.Н. Колосов, Н.Г. Зиняков, А.В. Андриясов, Е.В. Овчинникова, А.Д. Грехнева, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала // Молекулярная диагностика: Сборник трудов X юбилейной международной научно-практической конференции, Москва, 09–11 ноября 2021 года. Том 2. – 2021. – С. 216-217;

6. Андрейчук Д.Б. Актуальные вирусные инфекции в птицеводстве: анализ результатов молекулярной диагностики / Д.Б. Андрейчук, Л.О. Щербакова, **Н.А. Гусева**, Е.В. Овчинникова, З.Б. Никонова, А.В. Андриясов, Н.Г. Зиняков, С.Н. Колосов, И.А. Чвала // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. – 2021. – Т. 82. – С. 51-57.

7. Волкова М.А. Серологический мониторинг ньюкаслской болезни в Российской Федерации в 2023-2024 гг. / М.А. Волкова, И.А. Чвала, П.С. Ярославцева, М.А. Кулагина, О.С. Осипова, **Н.А. Гусева**, Д.Б. Андрейчук // Ветеринария сегодня. – 2025. – Т. 14 №4. – С. 391-400;

8. Патент «Штамм «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни птиц для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц».