

**АКШАЛОВА Перизат Батырханкызы**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА  
ГРИППА ПТИЦ**

06.02.02 – “Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология”

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

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

**Научный  
руководитель**

**Чвала Илья Александрович** кандидат ветеринарных наук

**Официальные  
оппоненты:**

**Джавадов Эдуард Джавадович** доктор ветеринарных наук, Академик РАН, профессор, профессор кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»;

**Яцентюк Светлана Петровна** кандидат биологических наук, заведующая отделом генодиагностики инфекционных болезней животных Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»

**Ведущая  
организация**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»

Защита диссертации состоится 27 апреля 2021 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» по адресу: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec. ФГБУ «ВНИИЗЖ» Тел: (4922) 529962

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

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2021г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**1.1 Актуальность темы.** Грипп птиц (ГП) – острая инфекционная вирусная болезнь птиц, характеризующаяся поражением органов пищеварения, дыхания, высокой летальностью. Возбудитель - РНК-содержащий вирус с сегментированным геномом семейства *Orthomyxoviridae*, подсемейства *Alphainfluenzavirus*, таксономически идентифицируется как *Influenza A virus* [ISTCV, 2019].

Актуальность проблемы болезни гриппа птиц обусловлена значимым экономическим ущербом птицеводству России, эпизоотической значимостью и распространением этого заболевания по всему миру.

На основании поверхностных антигенов гемагглютинина и нейраминидазы вирусы гриппа птиц (ВГП) разделяют на 16 подтипов по гемагглютинину (Н1–Н16) и 9 подтипов по нейраминидазе (N1–N9) [OIE, 2017]. Признано существование новых подтипов вируса гриппа типа А – Н17N10 и Н18N11, выделенных от рукокрылых в Гватемале [Tong S., 2012, 2013].

Согласно ряду критериев, в частности, показателю гибели цыплят при внутривенном заражении и структуре сайта нарезания гемагглютинина вируса гриппа птиц подразделяют на низкопатогенный и высокопатогенный. К вирусам высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП) относят изоляты подтипов Н5 и Н7, к вирусам низкопатогенного гриппа птиц (НПГП) – вирусы остальных подтипов и подтипов Н5 и Н7, не отвечающие критериям, характерным для ВПГП (МЭБ).

Эпизоотическая ситуация по ВПГП в Российской Федерации остается напряженной. В настоящее время широкое распространение получил грипп, вызванный вирусом Н5N8. Низковирулентные вирусы гриппа также периодически выявляются в стадах домашних птиц. Одним из наиболее актуальных для промышленного птицеводства низковирулентным вирусом является А/Н9N2, ранее получивший распространение в странах Азии.

Учитывая широкую распространенность вирусов данных подтипов, особую значимость приобретает разработка быстрого эффективного метода выявления ВГП, что является решающим условием организации необходимых мер борьбы с этим заболеванием.

При проведении мониторинговых и других исследований для выявления ВГП типа А сначала используют ОТ-ПЦР-РВ с использованием специфичных праймеров, фланкирующих ген М [Spackman E., 2008]. В случае получения положительного результата необходимо исключить наличие в пробе

гемагглютини́на подтипов H5 и H7, поскольку вирусы ГП данных подтипов могут быть высокопатогенными.

Несмотря на то, что для постановки диагноза с использованием методов лабораторной диагностики достаточно обнаружения белков или РНК вируса гриппа подтипа H5 и H7, для анализа эволюции вируса, выявления путей заноса и распространения инфекции актуальным является и идентификация NA – подтипа вируса, который указывается также при нотификации в МЭБ.

Традиционно, для типирования NA применяют реакцию торможения нейраминидазной активности (РТНА) [Pedersen, J.C. 2008], которая, впрочем, обладает рядом недостатков: получение результатов реакции занимает много времени, достаточно трудоемка, требует набора высококачественных моноспецифических антисывороток и контрольных антигенов, проводится с использованием высокотоксичных реагентов, ввиду чего необходимы особые условия проведения реакции. Следовательно, поиск новых высокочувствительных, специфичных и эффективных методов обнаружения и определения подтипа NA крайне необходим для своевременной постановки диагноза.

Использование ПЦР в режиме реального времени с праймерами, специфичными к разным подтипам нейраминидаз, позволит проводить быструю идентификацию вируса. Определение и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена нейраминидазы даст возможность не только типировать вирус, но и определить генетическую линию, к которой принадлежит данный изолят и выявить изменения, происходящие в вирусной популяции. В этой связи идентификация и изучение генетических особенностей нейраминидазы представляется актуальным.

**1.2 Степень разработанности проблемы.** Всемирной организацией здравоохранения животных рекомендованы к применению в диагностической практике утвержденные и соответствующие ее стандартам протоколы ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ, позволяющие быстро выявить и идентифицировать ВГП [ОИЕ, 2018]. Среди них указаны несколько систем для индикации ВГП с праймерами на ген M, а также системы идентификации различных подтипов, особенно H5, H7.

Однако, методы идентификации подтипа нейраминидазы вируса гриппа птиц на основе молекулярно-генетических методов на момент проведения исследований в России использовались ограниченно. Методические рекомендации для определения первичной структуры гена NA ВГП подтипов N2 и N8 не были разработаны, не изучены генетические особенности циркулирующих в РФ изолятов вируса, не установлены их филогенетические отношения.

В этой связи для полноты характеристики вируса важным является идентификация и изучение генетической принадлежности нейраминидазы на основе ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования.

**1.3 Цель и задачи исследований.** Целью работы являлась разработка методов на основе ПЦР для выявления гена NA ВГП, идентификация подтипов N2 и N8 и оценка молекулярно-генетических особенностей NA-генов изолятов ВГП, выявленных на территории Российской Федерации.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: 1) разработать методы выявления гена NA ВГП (подтипы N2 и N8) на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени;

2) разработать метод определения первичной структуры гена NA изолятов вируса гриппа птиц подтипов N2 и N8 с помощью нуклеотидного секвенирования;

3) определить полную нуклеотидную последовательность гена NA ВГП подтипов N2 и N8, выявленных в РФ в 2009-2020 гг.;

4) на основе определения полных нуклеотидных последовательностей гена NA изолятов ВГП подтипов N2 и N8, выявленных в РФ в 2009-2020 гг., провести их сравнительный и филогенетический анализ с известными штаммами данных подтипов.

**1.4 Научная новизна исследований.** В результате проведенных исследований подобраны оригинальные олигонуклеотидные праймеры и зонды, на основе которых разработаны методы выявления РНК ВГП подтипов N2 и N8 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени в различных образцах биологического материала. Разработан метод определения первичной структуры гена NA изолятов вируса гриппа птиц подтипов N2 и N8 с помощью нуклеотидного секвенирования с оригинальными праймерами. Определены полные нуклеотидные последовательности гена NA семи изолятов ВГП подтипа N2 и восьми изолятов ВГП подтипа N8, в том числе выделенных при вспышках заболевания в 2009, 2011, 2017-2020 гг. Опубликованы в GenBank и GisAID полные нуклеотидные последовательности гена NA ВГП подтипа N8 изолятов A/domestic goose/Omsk/1521-1/2020, A/duck/Chelyabinsk/1207-1/2020, A/goose/Kurgan/1345-25/2020, A/duck/Saratov/1578-2/2020, A/swan/Tumen/1479-2/2020 (MW276113, EPI1812535, EPI1811687, EPI1811679, EPI1814686).

**1.5 Теоретическая и практическая значимость исследования.** Проанализированы полные нуклеотидные последовательности гена NA изолятов ВГП подтипов N2 и N8, представленные в базе данных GenBank и платформе

GisAid, что позволило определить консервативные участки гена для подбора специфических праймеров и зондов.

Разработаны, одобрены Ученым советом, утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» и рекомендованы для использования в практике:

- «Методические рекомендации по выявлению РНК вируса гриппа птиц подтипа N2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени» (2019 г.);
- «Методические рекомендации по выявлению РНК вируса гриппа птиц подтипа N8 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени» (2019 г.);
- «Методические рекомендации по определению первичной структуры гена NA изолятов вируса гриппа птиц подтипа N2 с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования» (2020 г.);
- «Методические рекомендации по определению первичной структуры гена NA изолятов вируса гриппа птиц подтипа N8 с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования» (2020 г.).

С помощью разработанных методических рекомендаций в период с 2018 по 2020 гг. было исследовано 262 пробы биологического материала, из которых получено 61 положительный результат на N2 и 201 – на N8.

Штамм A/chicken/Kostroma/3175/17 H5N2, A/chicken/Kostroma/2367/18 H5N2 и A/turkey/Rostov/1/19 H5N8 вируса гриппа птиц детально охарактеризованы и депонированы в Коллекцию ФГБУ «ВНИИЗЖ».

**1.6 Методология и методы исследований.** В исследованиях применяли молекулярно-биологические (ОТ-ПЦР в реальном времени, ОТ-ПЦР, секвенирование и филогенетический анализ), вирусологические (культивирование вируса и титрование вируса по 50%-ному инфекционному действию), препаративные методы (электрофорез в агарозном геле, очистка продуктов ПЦР).

### **1.7 Положения, выносимые на защиту.**

- Система праймеров, подобранная для выявления подтипов N2 и N8 в ОТ-ПЦР-РВ является специфичной и позволяет обнаруживать РНК ВГП соответствующих подтипов в биологическом материале;

- Метод определения первичной структуры нейраминидазы ВГП подтипов N2 и N8 позволил определить полную последовательность гена NA у 7 изолятов подтипа N2 и у 9 изолятов подтипа N8, выявленных на территории России в 2009, 2011, 2017-2020 гг.;

- Филогенетический анализ геномов изолятов подтверждает, что занос ВГП на территорию Российской Федерации происходит преимущественно из Юго-

Восточной Азии, причем изоляты подтипа N2 группируются в три генетические группы, изоляты подтипа N8 – в четыре группы;

- Изоляты ВГП подтипа H5N8, выявленные на территории России в период 2016-2020 гг., генетически различны, что указывает на непрекращающуюся эволюцию внутри изученного подтипа.

**1.8 Личный вклад соискателя.** Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю Чвала И.А., к.б.н. Колосову С.Н., к.б.н. Андриясову А.В., к.б.н. Щербакковой Л.О., д.б.н. Мудрак Н.С., к.б.н. Зинякову Н.Г., к.б.н. Сосипаторовой В.Ю., к.б.н. Козлову А.А. и всему коллективу референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ».

**1.9 Степень достоверности и апробации результатов.** Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета и методической комиссии ФГБУ «ВНИИЗЖ», на V Международной научной конференции "Достижения молодых ученых - в ветеринарную практику" (г. Владимир 2019 г.). Результаты исследований опубликованы в материалах Международной научно-практической конференции молодых ученых "Актуальные вопросы фундаментальных и прикладных исследований в области ветеринарной медицины, биологии и биотехнологии" (г. Алматы, 2019 г.), в Сборнике научных трудов Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020» (г. Москва, 2020 г.). Достоверность проведенных исследований подтверждена результатами комиссионных испытаний.

**1.10 Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 2 работы опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

**1.11 Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 173 страницах компьютерного текста и содержит следующие разделы: обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение. Работа иллюстрирована 19 рисунками и 37 таблицами. Список литературы включает 212 источников, в том числе 44 работ на русском языке. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную новизну и практическую значимость.

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы и методы

**Вирусы.** В работе использованы изоляты ВГП подтипов N2 и N8 из рабочей коллекции референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ».

**Куриные эмбрионы.** В качестве чувствительных тест-объектов для определения титра инфекционной активности вируса гриппа птиц использовали 11-суточные СПФ куриных эмбрионов (СПФ-КЭ) фирмы VALO (Германия).

**Наборы реактивов:** для выделения РНК/ДНК использовали "АмплиПрайм РИБО-сорб" (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, кат. № 105-20); для ПЦР и ПЦР-РВ использовали набор термостабильной Taq ДНК-полимеразы GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, кат. № M8296) и РНК-зависимой ДНК-полимеразы (ревертаза) вируса миелобластома птиц AMV Reverse Transcriptase (Promega, кат. № M5108), обратная транскриптаза M-MLV; очистку фрагментов ДНК проводили набором Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System (250) (Promega A9282), секвенирование осуществляли с использованием наборов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit («Applied Biosystems», США).

**Растворы, буферные смеси:** буфер ТВЕ: 0.1М Трис-НСI, (рН 8,3); 0,083М борная кислота; 1mM EDTA; ФБР: 0,01 М фосфатный буфер; 0,14 М NaCl; рН 7,2-7,4; буфер для ПЦР 5X Colorless Go Taq Flexi Buffer («Promega», США); 25мМ раствор хлорида магния; 100 мМ раствор дезоксинуклеозид-трифосфатов (дНТФ); маркер Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus («Fermentas», Литва); 0,001% р-р бромистого этидия; деионизованная вода; 96% этиловый спирт.

**Праймеры.** В работе использовали несколько систем праймеров: для выявления РНК ВГП подтипов N2 и N8 в различных образцах биологического материала, для определения полной нуклеотидной последовательности гена NA изолятов ВГП подтипов N2 и N8, а также системы праймеров для индикации РНК ВГП в ПЦР в режиме реального времени.

**Подбор праймеров и зондов для ОТ-ПЦР-РВ и классической ОТ-ПЦР.** Выбор праймеров осуществляли анализируя данные литературы и нуклеотидные последовательности гена NA изолятов ВГП подтипов N2 и N8, опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI (с 1999 по 2018 гг.)

**Выделение суммарной РНК.** Выделение РНК вирусов из аллантоисной жидкости СПФ куриных эмбрионов (КЭ), зараженных изолятами, проводили с использованием набора «АмплиПрайм РИБО-сорб» в соответствии с инструкцией по его применению.



**ОТ-ПЦР в режиме реального времени.** Реакция обратной транскрипции и собственно ПЦР проводили с использованием отдельных ферментов Taq-ДНК-полимеразы и обратной транскриптазы (AMV или M-MLV), олигонуклеотидных праймеров и зонда, в программируемом амплификаторе Rotor-Gene Q (Германия). Расчеты проводились с использованием программного обеспечения амплификатора.

**Классическая ОТ-ПЦР.** Обратную транскрипцию с последующей амплификацией фрагментов гена NA для определения полной нуклеотидной последовательности изолятов ВГП подтипов N2 и N8 проводили в программируемых амплификаторах BioRad и Mini Cycler (MJ Research, США). Для повышения чувствительности реакции в случае не выявления вирусспецифических фрагментов кДНК после первой ПЦР, проводили “гнездовой” (nested) вариант ПЦР с парами внутренних праймеров. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

**Очистка продуктов ПЦР.** Амплифицированные в ПЦР фрагменты кДНК очищали с помощью набора “Wizard PCR Preps” (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя.

**Секвенирование амплифицированных фрагментов кДНК.** Прямое секвенирование фрагментов кДНК ВГП осуществляли с помощью набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit («Applied Biosystems», США) на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 («Applied Biosystems», США).

**Компьютерный анализ и сравнение первичных структур нуклеиновых кислот.** Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit версия 7.0.5.3. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Для сравнения полных последовательностей гена NA использовали последовательности гена NA штаммов ВГП, полученные из международной базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>). Для поиска последовательностей наиболее близких к последовательностям изучаемых изолятов пользовались ресурсом Blast NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы множественного выравнивания ClustalW. Построение филогенетических деревьев проводили с помощью алгоритма NJ (в том числе с использованием метода численного ресэмплинга «бутстреп») в реализации пакета MEGA, версия 7.0.26.

**Определение титра инфекционной активности вируса гриппа птиц.** Использовали 11-суточные эмбрионы СПФ-кур. Применяли метод десятикратных

последовательных разведений. Каждое разведение вируса инокулировали в аллантаоисную полость КЭ. Титр вируса в исходном материале определяли по методу Кербера и выражали в единицах  $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ .

## 2.2 Результаты собственных исследований

**Выбор праймеров для амплификации фрагментов гена NA изолятов ВГП подтипов N2 и N8 в ОТ-ПЦР-РВ.** Для сравнительного анализа была сформирована первоначальная выборка из 2822 нуклеотидных последовательностей гена NA изолятов ВГП/N2 и 619 последовательностей изолятов ВГП подтипа N8. После пошаговой оптимизации, удаления из выборки наиболее генетически идентичных последовательностей, для анализа было выбрано 169 и 75 наиболее отличающихся между собой последовательностей, соответственно. Одновременно с самостоятельным подбором праймеров анализировали ранее описанные результаты других авторов. В результате проведенной работы были выбраны и синтезированы 11 праймеров и 6 зондов для выявления РНК ВГП подтипа N2 и 4 праймера и 5 зондов для выявления РНК ВГП подтипа N8. Для экспериментальной проверки подобранных праймеров и зондов была проведена серия опытов с различными комбинациями праймеров и зондов для выбора оптимальных из них.

**Оптимизация метода выявления генома вируса гриппа птиц подтипов N2 и N8.** В целях повышения чувствительности, специфичности и скорости ОТ-ПЦР-РВ для выявления РНК ВГП подтипов N2 и N8 были оптимизированы концентрации компонентов (хлорид магния, праймеры, флуоресцентный зонд, ревертаза) и температурно-временной режим реакции. Непосредственно перед выполнением комплекса работ по оптимизации условий постановки ОТ-ПЦР-РВ на ген NA, приготовленные десятикратные разведения ( $10^{-1} - 10^{-6}$ ) выделенной суммарной РНК изолятов ВГП N2 и N8, были проверены в ОТ-ПЦР-РВ на ген M с системой праймеров и зондом, рекомендованными МЭБ [ОИЕ, 2018; Spackman E., 2002; Suarez D.L., 2007]. Результаты, полученные в ОТ-ПЦР-РВ на ген M с изолятами ВГП подтипов N2 и N8, были использованы для сопоставления с результатами оптимизированной ОТ-ПЦР-РВ на ген NA (табл. 1 и 2).

**Сравнительная чувствительность и специфичность метода ОТ-ПЦР-РВ для выявления генома ВГП подтипов N2 и N8.** Чувствительность метода ОТ-ПЦР-РВ с оптимизированными условиями реакции для выявления гена NA также сравнивали системой праймеров и зонда на фрагмент гена M (табл. 1 и 2), так как выявление гена M является первоочередным основным методом при диагностике вируса гриппа птиц, подтвердивший свою эффективность. Для объективной оценки

результатов реакции вычисляли среднее значение  $C_t$ , стандартное отклонение и коэффициент вариации.

Таблица 1 - Сравнение результатов ОТ-ПЦР-РВ на ген М и NA/N2

(n=3)

Ген	Разведение	Среднее значение $C_t$	Стандартное отклонение ( $\sigma$ )	95% доверительный интервал	Коэффициент вариации
<b>М</b>	$10^{-4}$	26,69	0,06	26,54-26,84	0,23
	$10^{-5}$	30,40	0,28	29,70-31,09	0,92
<b>NA / N2 станд.</b>	$10^{-4}$	27,79	0,24	27,19-28,39	0,87
	$10^{-5}$	32,48	0,41	31,47-33,50	1,26
<b>NA / N2 оптим.</b>	$10^{-4}$	26,44	0,08	26,24-26,64	0,30
	$10^{-5}$	30,70	0,85	28,57-32,82	2,78

Примечание: NA станд. – условия реакции до оптимизации по протоколу для выявления гена М; NA оптим. – с оптимизированными условиями реакции.

Таблица 2 - Сравнение результатов ОТ-ПЦР-РВ на ген М и NA/N8

(n=3)

Ген	Разведение	Среднее значение $C_t$	Стандартное отклонение ( $\sigma$ )	95% доверительный интервал	Коэффициент вариации
<b>М</b>	$10^{-3}$	28,68	0,21	28,16-29,20	0,73
	$10^{-4}$	32,86	0,25	32,23-33,49	0,77
<b>NA / N8 станд.</b>	$10^{-3}$	28,51	0,99	26,05-30,96	3,47
	$10^{-4}$	32,03	0,95	29,69-34,38	2,95
<b>NA / N8 оптим.</b>	$10^{-3}$	27,67	0,16	27,28-28,07	0,57
	$10^{-4}$	30,56	0,32	30,06-31,66	1,04

Примечание: NA станд. – условия реакции до оптимизации по протоколу для выявления гена М; NA оптим. – с оптимизированными условиями реакции.

В результате оптимизации концентрации компонентов и температурно-временных параметров реакции на ген NA, значения порогового цикла ( $C_t$ ) для образцов десятикратных разведений изолятов ВГП были сопоставимы со значениями  $C_t$  для гена М.

Для оценки аналитической чувствительности разрабатываемого метода были приготовлены последовательные десятикратные разведения выделенной суммарной РНК изолятов ВГП. С целью получения более достоверных данных, все десятикратные разведения проб исследовали в трех повторностях. Полученные значения аналитической чувствительности метода ОТ-ПЦР для выявления ВГП подтипов N2 и N8 представлены в табл. 3 и 4.

Значения минимальных титров десятикратных разведений изолятов ВГП, выявленных в ПЦР, находятся в пределах от 1,2 до 3,4 lg(ЭИД50/ см3).

Таблица 3 - Чувствительность метода выявления ВГП подтипа N2 с помощью ОТ-ПЦР-РВ

Изолят ВГП	Титр вируса lg(ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )	Макс. разв-ие, (lg)* / Чувств-ть метода, lg(ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )
A/chicken/Tadjikistan/2379/18 H9N2	6,65	5/1,65
A/chicken/Primorsky/3124/18 H9N2	8,45	6/2,45
A/chicken/Chelyabinsk/30/19 H9N2	7,95	5/2,95
A/bird/Amursky/21/12 H9N2	7,2	6/1,2
A/duck/Primorie/2621/2001 H5N2	8,2	5/3,2
A/turkey/Massachusetts/65 H6N2	7,6	5/2,6

Таблица 4 - Чувствительность метода выявления ВГП подтипа N8 с помощью ОТ-ПЦР-РВ

Изолят ВГП	Титр вируса lg(ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )	Макс. разв-ие, (lg)* / Чувств-ть метода, lg(ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )
A/turkey/Hungary/53433/16 H5N8	8,2	5/3,2
A/turkey/England/52131/16 H5N8	9,45	6/3,45
A/swan/Voronezh/2/17 H5N8	8,8	5/3,8
A/chicken/Moscow/94/17	8,1	5/3,1
A/mallard/Krasnoyarsk/436/11 H3N8	7,2	4/3,2
A/duck/Ukraine/1/63 H3N8	7,6	5/2,6
A/mynah/Massachusetts/71 H4N8	8,1	5/3,1
A/wigeon/Sakha/1/14 H5N8	6,95	5/1,95

В ходе экспериментальной работы были получены отрицательные результаты со всеми неспецифическими патогенами, подтверждающие специфичность разработанной нами ОТ-ПЦР-РВ (таблица 5).

Таблица 5 - Проверка специфичности праймеров на ВГП N2 и N8

Пробы	Название изолята	Ct (M gen)	Ct (N2)	Ct (N8)
H5N1	A/chicken/Adygea/203/06 H5N1	13,76	-	-
H9N2	A/chicken/Tadjikistan/2379/18 H9N2	17,68	16,64	-
H2N3	A/duck/Germany/1215/73 H2N3	20,10	-	-
H8N4	A/turkey/Ontario/6118/68 H8N4	22,56	-	-
H12N5	A/duck/Alberta/60/76 H12N5	20,13	-	-
H3N6	A/wild duck/Altai/1732/2013 H3N6	20,15	-	-
H4N6	A/shoveler/Krasnoyarsk/1586/08 H4N6	28,32	-	-
H10N7	A/mallard/Khabarovsk/12/2014 H10N7	17,92	-	-
H5N8	A/wigeon/Sakha/1/14 H5N8	12,75	-	13,21

Примечание: «-» отрицательный результат реакции

**Выявление гена NA ВГП/А и идентификация подтипов N2 и N8 в патологическом материале с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени.** С помощью данных методических рекомендаций в период с 2018 по 2020 гг. были исследованы 262 пробы, в результате которых РНК ВГП подтипа N2 выявлена в 61

пробе биологического материала, подтип N8 обнаружен в 201 пробе от различных видов домашних и диких птиц. Данные исследований приведены в таблице 6.

Таблица 6 - Результаты исследования проб патологического материала на наличие генома ВГП типа А и идентификация подтипа N2 и N8 в ОТ-ПЦР-РВ

Регионы	N2			N8			Всего	
	2018 +/-	2019 +/-	2020 +/-	2018 +/-	2019 +/-	2020 +/-	N2	N8
Таджикистан	1	-	-	-	-	-	1	0
Костромская обл.	8/-	-	-	-	-	-	8	0
Приморский край	9/-	-	-	-	-	-	9	0
Р. Башкортостан	9/-	14/-	-	-	-	-	23	0
Курская обл.	-	-	-	12/-	-	-	0	12
Пензенская обл.	-	-	-	22/-	-	-	0	22
Саратовская обл.	-	-	-	1/-	-	4/-	0	5
Р. Татарстан	-	11/-	2/-	26/-	-	-	13	26
Орловская обл.	-	-	-	4/-	-	-	0	4
Р. Удмуртия	-	-	-	7/-	-	-	0	7
Р. Марий Эл	-	-	-	5/-	-	-	0	5
Смоленская обл.	-	-	-	5/-	-	-	0	5
Ростовская обл.	-	-	-	16/-	2/-	-	0	18
Московская обл.	-	-	-	1/-	-	-	0	1
Воронежская обл.	-	-	-	10/-	-	-	0	10
Амурская обл.	2/-	-	-	-	-	-	0	2
Челябинская обл.	-	-	5/5	-	15/-	5/5	5	20
Забайкальский край	-	3/-	-	-	-	-	3	0
Хабаровский край	-	-	-	-	1/-	-	0	1
Камчатский край	-	-	-	-	1/-	-	0	1
Волгоградская обл.	-	-	8/-	-	-	-	0	8
Омская обл.	-	-	-	-	-	31/-	0	31
Курганская обл.	-	-	-	-	-	9/-	0	9
Тюменская обл.	-	-	-	-	-	10/-	0	10
Карачаево-Черкесская Респ.	-	-	-	-	-	3/-	0	3
							<b>61</b>	<b>201</b>

Примечание: В числителе указано количество положительных результатов, в знаменателе количество отрицательных результатов; «-» отрицательный результат реакции

Исследование проб патологического материала показало возможность применения предложенной системы праймеров и зонда для выявления ВГП в пробах патологического материала.

**Разработка метода определения первичной структуры гена NA изолятов ВГП подтипов N2 и N8 с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования.** В результате проведенного теоретического анализа были выбраны и синтезированы 16 прямых и 13 обратных праймеров для выявления РНК ВГП подтипа N2 и 10 прямых и 8 обратных праймеров для выявления РНК ВГП подтипа N8 в ОТ-ПЦР.

Однако, не все праймеры позволили получить вирусспецифический фрагмент требуемого размера для всех изолятов. Это было установлено в процессе проведения ОТ-ПЦР с использованием различных вариантов разработанных праймеров, подстраивая температуру, время отжига в зависимости от длины праймеров.

В результате проведенных исследований были выбраны 8 прямых и 6 обратных праймеров для амплификации фрагментов гена NA подтипа N2 и 8 прямых и 7 обратных праймеров для выявления ВГП подтипа N8 в ОТ-ПЦР и последующего секвенирования (рис. 1-2).

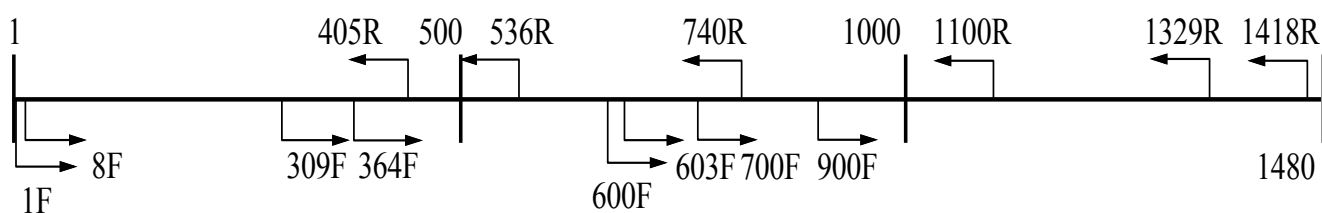


Рисунок 1 – Схема расположения праймеров для амплификации и секвенирования фрагментов гена NA подтипа N2

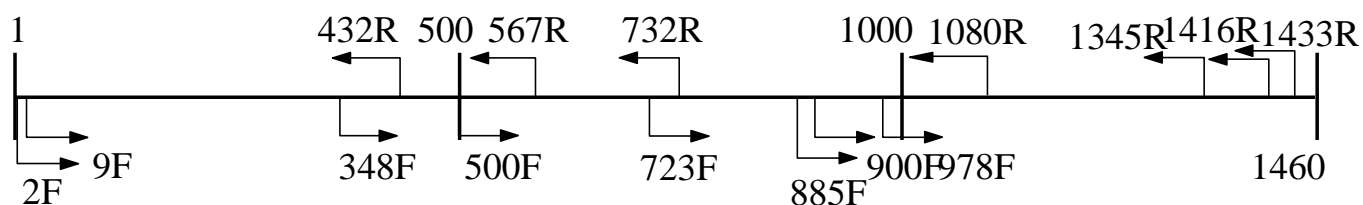


Рисунок 2 – Схема расположения праймеров для амплификации и секвенирования фрагментов гена NA подтипа N8

Выбранные праймеры способны амплифицировать фрагменты длиной 730-1100 н.п. (N2) и 367-997 н.п. (N8) в ОТ-ПЦР и осуществлять последующее полное секвенирование изолятов с использованием нескольких пар праймеров.

Для повышения чувствительности реакции воспользовались двухступенчатой постановкой с «гнездовой» (nested) ПЦР, осуществляемой с использованием двух пар праймеров. Для этого продукт первого этапа ПЦР использовали в качестве матрицы для nested ПЦР. Режимы амплификации выглядят следующим образом: 3 мин при 95<sup>0</sup>С, и последующие 25 циклов стандартной ПЦР, состоящие из денатурации ДНК в течение 50 сек. при 95<sup>0</sup>С, отжига праймеров – 50 сек. при 55<sup>0</sup>С, элонгации кДНК – 50 сек. при 72<sup>0</sup>С. После завершения последнего цикла следовал прогрев смеси в течение 2 мин. при 72<sup>0</sup>С. Визуализацию результатов ОТ-ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, окрашенном 0,001% раствором этидиум бромидом.

**Определение аналитической чувствительности методов выявления ВГП подтипов N2 и N8 с помощью “гнездовой” ПЦР.** Оценку аналитической чувствительности ОТ-ПЦР проводили с десятикратными разведениями РНК, выделенной из аллантоисной жидкости КЭ, зараженных изолятами ВГП, выделенными на территории России, Венгрии, Англии, Украины, США. Полученные значения представлены в таблице 7 и 8.

Таблица 7 - Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР для выявления ВГП подтипа N2

Название изолята	Титр вируса, lg ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	Чувствительность ОТ-ПЦР, Мин. титр вируса lg ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>
A/chicken/Tadgikistan/2379/18 H9N2	6,65	2,25
A/chicken/Primorsky/3039/18 H9N2	8,45	2,45
A/chicken/Chelyabinsk/30/19 H9N2	7,95	1,95
A/bird/Amursky/21/12 H9N2	7,2	1,2
A/wild duck/Vladimir/446/09 H4N2	5,2	1,2
A/duck/Primorie/2621/2001 H5N2	8,2	4,2
A/turkey/Mass/65 H6N2	7,6	3,6
A/chicken/Kostroma/3175/17 H5N2	8,25	1,25
A/chicken/Kostroma/2367/18 H5N2	8,88	2,88
A/chicken/Primorsk/419/18 H9N2	10,13	4,13

Таблица 8 - Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР для выявления ВГП подтипа N8

Название изолята	Титр вируса, lg ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	Чувствительность ОТ-ПЦР, Мин. титр вируса, lg ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>
A/wigeon/Sakha/1/14 H5N8	6,9	1,9
A/mallard/Krasnoyarsk/436/11 H3N8	7,2	1,2
A/goose/Kalmykia/813/16 H5N8	8,2	2,2
A/swan/Voronezh/2/17 H5N8	8,8	3,8
A/chicken/Penza/1185/18 H5N8	7,95	3,95
A/duck/Ukraine/1/63 H3N8	7,6	2,6
A/mynah/Mass/71 H4N8	8,1	4,1
A/turkey/England/52131/16 H5N8	9,4	4,4
A/turkey/Hungary/53433/16 H5N8	9	4

Пределом чувствительности в nested-ПЦР было разведение  $10^{-6}$ . Значения минимальных титров десятикратных разведений РНК находятся в пределах от 1,2 до 4,4 lg ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Праймеры, позволяющие получать вирусспецифический фрагмент кДНК для всех исследуемых штаммов ВГП(А) подтипов N2 и N8, указаны в таблицах 9 и 10.

Таблица 9 - Олигонуклеотидные пары праймеров, используемые для амплификации фрагментов гена NA изолятов ВГП/N2 в ОТ-ПЦР

№ фрагмента	Пары праймеров для ОТ-ПЦР (праймеры для секвенирования)	Длина фрагмента н.п.
1	1F-740R (8F, 309F, 405R, 536R)	740
2	309F-1100R (364F, 740R)	791
3	309F-1418R (600F, 603F, 1100R)	1109
4	600F-1418R (700F, 900F, 1100R, 1329R)	818

Таблица 10 - Олигонуклеотидные пары праймеров, используемые для амплификации фрагментов гена NA изолятов ВГП/N8 в ОТ-ПЦР

№ фрагмента	Пары праймеров для ОТ-ПЦР (праймеры для секвенирования)	Длина фрагмента н.п.
1	2F-732R (348F, 567R)	730
2	348F-1345R (500F, 732R)	997
3	500F-1080R (885F)	580
4	885F-1426R (1345R)	541
5	723F-1433R (978F, 1345R)	710

В итоге, для определения первичной структуры гена NA изолятов вируса ВГП подтипов N2 и N8 в ОТ-ПЦР необходимо амплифицировать 4 и 5 фрагментов, соответственно. С целью получения нескольких перекрывающихся фрагментов для более достоверного прочтения последовательности дополнительно использовали праймеры, данные в скобках. С помощью разработанной методики по определению первичной структуры гена NA изолятов ВГП подтипов N2 и N8 с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования достоверно определены полные последовательности 7 изолятов ВГП подтипа N2 и 9 изолятов ВГП подтипа N8.

**Генетический анализ нуклеотидных последовательностей гена нейраминидазы подтипа N2 ВГП.** В анализе участвовали 47 нуклеотидных последовательности гена нейраминидазы общей длиной 1400 н.о. На основе выравнивания было построено филогенетическое древо (Рисунок 3). В скобках указаны наименование линий согласно классификации по нейраминидазе, предложенной Xu J. *et al* [Xu J. *et al.*, 2012]. По системе классификации Xu J. *et al* нейраминидаза подтипа N2 делится на две линии: 2А и 2В, где 2А – линия птиц, 2В – людей и свиней. Линия 2А в свою очередь делится на три сублинии: 2А.1 (Н9N2), 2А.2 (Евразийская линия), 2А.3 (Североамериканская линия). Однако наши исследования демонстрируют необходимость выделения еще как минимум одной отдельной генетической группы, обозначенной как 2А.1.2. На построенной дендрограмме по нуклеотидной последовательности гена NA четко отражаются 4 отдельные группы. Согласно результатам анализа в группу 2А.1.2 попадает вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/19 (H9N2). В данную группу вошли изоляты, выделенные



преимущественно на территории Израиля, Ирана, Египта. При сравнении данного изолята с последовательностями штаммов вируса гриппа, опубликованные в NCBI, с помощью программы BLAST анализ показал наиболее близкое сходство с группой изолятов, выявленных в Израиле (99,64%).

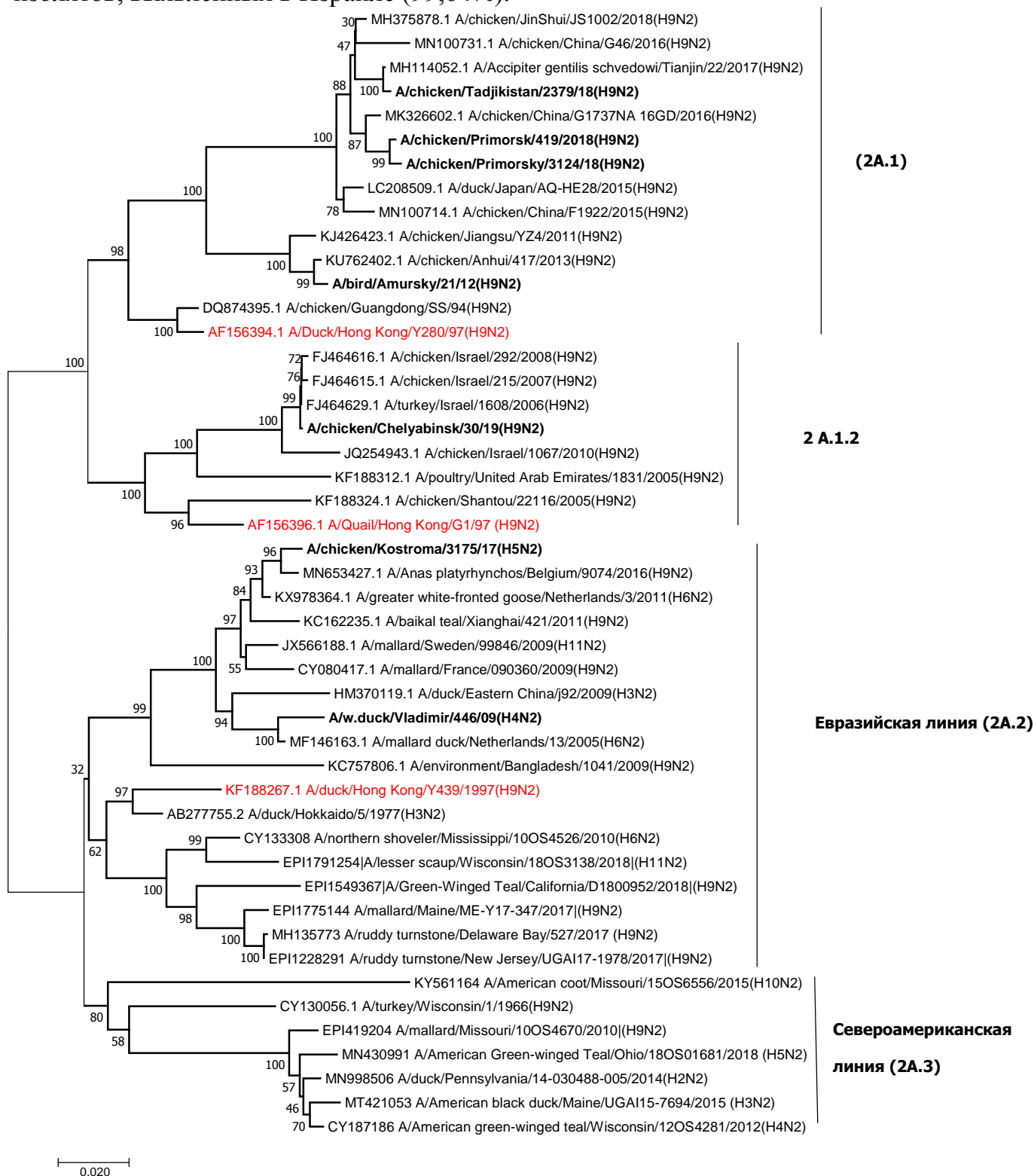


Рисунок 3 – Дендрограмма, построенная по методу «Bootstrap NJ» по нуклеотидной последовательности фрагмента гена NA (1-1360 п.н. ОРС) вируса гриппа птиц (Российские оригинальные штаммы отмечены черным полужирным шрифтом)

На основе сравнения нуклеотидных последовательностей изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/19 (H9N2) с изолятами, ранее выявленными на территории России наиболее близкое родство установлено с изолятами A/chicken/Siberia/03/2018 и A/chicken/ Amur\_Russia/17/2018 по гену NA.

Вирусы A/bird/Amursky/21/12 (H9N2), A/chicken/Primorsk/419/18 (H9N2), A/chicken/Primorsky/3124/18 (H9N2), A/chicken/Tadjikistan/2379/18 (H9N2) вошли в группу изолятов, выделенных на территории Восточной Азии, преимущественно китайские изоляты, что соответствует генетической группе 2A.1. А вот в генетическую группу 2A.2, куда не входят ни один из выявленных в России вирусов подтипа H9, вошли изоляты A/chicken/Kostroma/3175/17 (H5N2) и A/w.duck/Vladimir/446/09 (H4N2). Группу 2A.2 составляют последовательности изолятов, выделенные в Европе, Азии и Африке.

Для изолята A/chicken/Kostroma/3175/17 (H5N2) наибольший процент сходства по NA гену (99,11%) наблюдали с вирусом A/Anas platyrhynchos/Belgium/9074/2016 (H9N2). Вирус A/w.duck/Vladimir/446/09 (H4N2) имел наибольшее сходство с изолятами, выделенными на территории Нидерландов, Болгарии, Швеции и Южной Африки (98,7% сходства с вирусом A/mallard duck/Netherlands/13/2005 (H6N2) и 98,3% сходства с вирусом A/mule duck/Bulgaria/25/2011 (H5N2)).

Сравнительный анализ полученных последовательностей гена NA семи изолятов показал, что разница между изолятами достигает от 3 до 20 %. Средние значения внутригрупповых различий нуклеотидной последовательности изолятов генетической группы 2A.1 составили 6%, группы 2A.1.2 – 5,7 %, группы 2A.2 – 5%. Уровень различий между изолятами группы 2A.1 и изолятами группы 2A.1.2 достигают 12%, а изолятами группы 2A.2 – 19%.

Для подтверждения о совместном наследовании или существовании устойчивых сочетаний генов NA и HA была построена дендрограмма по нуклеотидной последовательности фрагмента гена NA вируса гриппа птиц подтипа H9N2 с использованием этих же самых изолятов (Рисунок 4). Анализ включал 36 нуклеотидных последовательности длиной 1600 н.о. В анализ естественно не вошли изоляты A/chicken/Kostroma/3175/17 (H5N2) и A/w.duck/Vladimir/446/09 (H4N2).

Проведенный анализ демонстрирует сходную топологию сравниваемых изолятов на филогенетических деревьях построенных по нуклеотидным последовательностям генов NA и HA. Изученные вирусы формируют схожие группы. Так вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/19 (H9N2) относится к генетической группе G1, а вирусы A/bird/Amursky/21/12 (H9N2), A/chicken/Primorsk/419/18

(H9N2), A/chicken/Primorsky/3124/18 (H9N2), A/chicken/Tadjikistan/2379/18 (H9N2) относятся к генетической группе Y280.

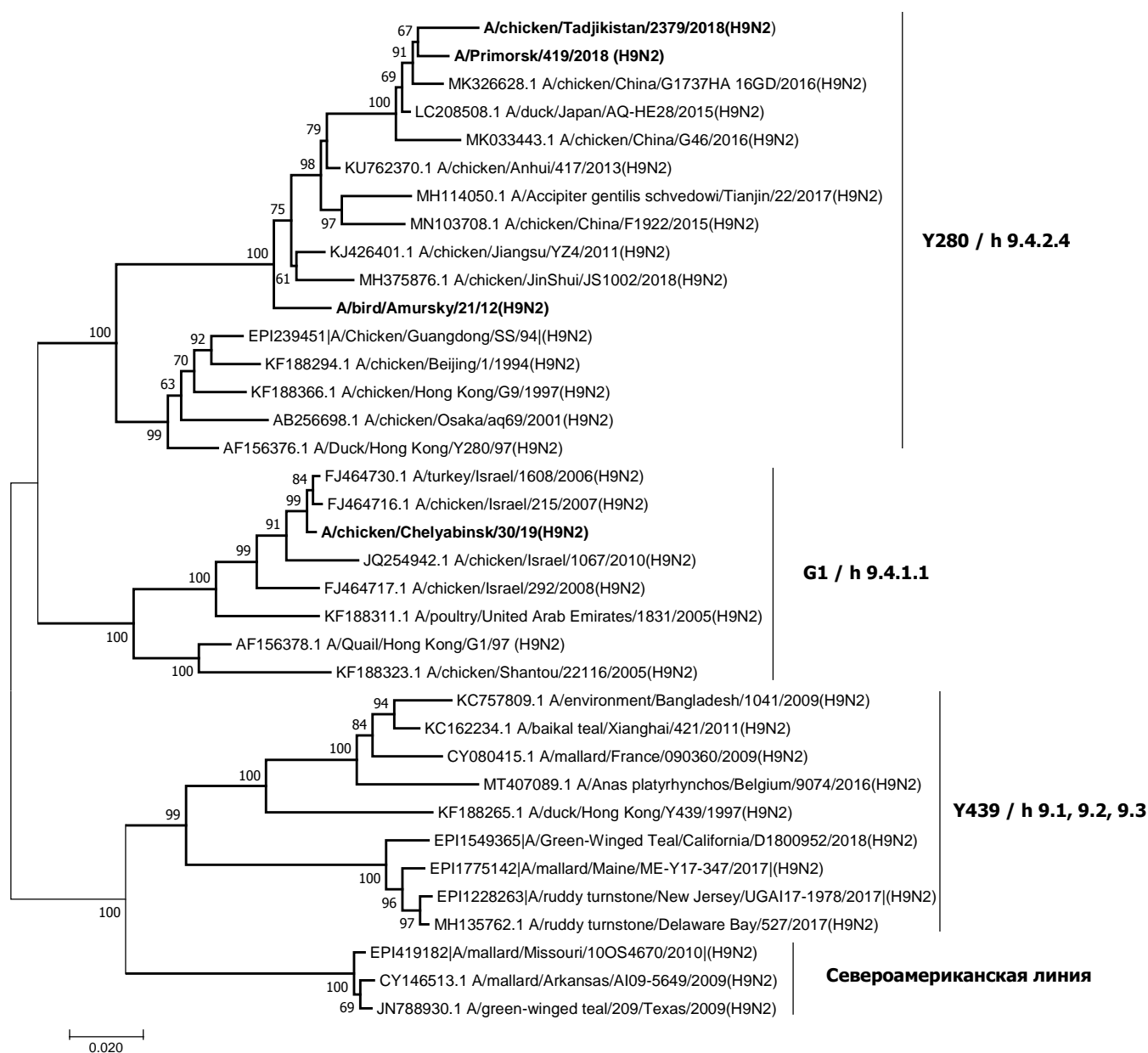


Рисунок 4 – Дендрограмма, построенная по методу «Bootstrap NJ» по нуклеотидной последовательности гена HA / H9N2 (1-1565 п.н. OPC)

По результатам анализа аминокислотной последовательности исследуемых нами изолятов замен в активном сайте нейраминидазы не обнаружено. Отдельно стоит отметить делеции в вирусной нейраминидазе. Для трех изолятов A/bird/Amursky/21/12 (H9N2) A/chicken/Tadjikistan/2379/18 (H9N2) и A/chicken/Primorsky/3124/18 (H9N2) характерна общая делеция в 9 нуклеотидов (с 207-215 н.). Практически в этом же месте, в районе «стебля» у изолята A/chicken/Kostroma/3175/17 (H5N2) находится делеция в 72 нуклеотидных основания. У изолята A/chicken/Tadjikistan/2379/18 (H9N2) имеется дополнительная

делеция в три нуклеотида (с 119 по 121н.). Делеция 20 аминокислот часто наблюдается при передаче ВГ от водоплавающих птиц домашней птице (Matsuoka et al., 2009; Hoffmann et al., 2012; Blumenkrantz et al., 2013; Sun et al., 2013; Bi et al., 2015).

**Генетический анализ нуклеотидных последовательностей гена нейраминидазы подтипа N8 ВГП.** Одной из главных задач исследования было получение актуальных сведений о генетическом родстве изолятов ВГП, выделенных в последнее время на территории РФ. При генетической характеристике ВГП ориентируются на систему классификации по гемагглютинину, которая была внедрена рабочей группой ВОЗ/МЭБ/ФАО и широко используется. Согласно литературным источникам, официальной регламентированной классификации по нейраминидазе не установлено. Публикация, где описана классификация подтипов нейраминидазы, сделана в 2012г. американскими учеными из университета Небраска. По данным авторов Ху J. *et al* нейраминидаза подтипа N8 делится на 3 линии, каждой из которых присвоена буква: 8А, 8В, 8С [Ху J. *et al.*, 2012]. Линия 8А является Североамериканской, линия 8В представляет собой вирусы, выделенные у лошадей, а к 8С относится Евразийская линия. В данную классификацию не вошли вирусы подтипа Н5N8, которые впервые были выявлены в Китае в 2010 г., впоследствии получившие широкое распространение в Юго-Восточной Азии, России, Европе и в Северной Америке. Поэтому при проведении филогенетического анализа помимо известной классификации по нейраминидазе, учитывались данные и по классификации гемагглютинина, описанные в публикациях. Рассматривались 92 нуклеотидных последовательности гена нейраминидазы размером 1370 н.о.

Филогенетические деревья, построенные на основе нуклеотидных последовательностей гена NA, показали наличие четырех различных групп (Рисунок 5). Исходя из классификации нейраминидазы, разработанной Ху J. *et al* делаем вывод, что все изоляты, использованные в работе, относятся к Евразийской линии 8С, которая по истечении времени развилась на несколько отдельных групп. Обозначение групп и подгрупп, отчетливо отраженных на дереве, было выполнено самостоятельно, на примере классификации нейраминидазы других подтипов, также разработанной Ху J. *et al.* В результате каждой группе была присвоена нумерация: первая группа названа 8С.1, вторая - 8С.2, третья и четвертая - 8С.3 и 8С.4, соответственно. В группы 8С.1, 8С.2 и 8С.3 вошли изоляты НВГП. В 8С.3 группу попал изолят A/mallard/Krasnoyarsk/436/11 (Н3N8). Данную подгруппу формируют вирусы выделенные на территории Восточной и Юго-Восточной Азии.



Рисунок 5 – Группа изолятов, циркулирующих на территории РФ

Для изолята A/mallard/Krasnoyarsk/436/11 (H3N8) наблюдали максимальную степень сходства с вирусами A/whooper swan/Mongolia/1-27/2007 (H3N8), A/wild duck/Jiangxi/19615/2009(H7N8), A/duck/Thailand/CU-7518C/2010(H3N8), A/duck/Shanghai/602/2009 (H10N8).

Наиболее актуальной, требующей детального изучения, является группа 8С.4, основу которой составляют изоляты высокопатогенного ВГП подтипа H5N8. Как видно из дерева, изначально нейраминидаза подтипа N8 была широко распространена среди низкопатогенных ВГП в сочетании с различными НА. В группу 8С.4 вирусов вошли изоляты A/goose/Kalmykia/813/16 (H5N8), A/swan/Voronezh/2/17 (H5N8), A/chicken/Penza/1185/18 (H5N8), A/turkey/England/52131/16 (H5N8), A/goose/Omsk/1521-1/2020, A/duck/Saratov/1578-2/2020, A/duck/Chelyabinsk/1207-1/2020 (H5N8). Изолят A/chicken/Penza/1185/18 (H5N8) имел наибольшую степень сходства (99,26%) с вирусами A/Duck/Cairo/1795CA/2017 (H5N8) и A/Ruddy Shelduck/AN/2-14-12/2016 (H5N8). Изолят A/goose/Kalmykia/813/16 (H5N8) имел наибольший процент сходства с вирусами A/Mulard Duck/Hungary/59163/2016(H5N8) (99,71%) и A/reverse genetic/France/RG1/2016(H5N8) (99,5%).

Изоляты, выявленные в 2020 г. наглядно демонстрируют эволюцию вирусов группы 8С.4. Поскольку очень вероятен процесс реассортации высокопатогенного ВГП с низкопатогенным, способствующий формированию новых вариантов вируса, слабая изученность низкопатогенных ВГП из групп 8С.1, 8С.2 и 8С.3 таит в себе опасность возникновения новых изолятов. Анализ изолятов ВГП подтипа H5N8, выявленных в 2020, демонстрирует значительно большую гетерогенность относительно группы изолятов выявленных в период 2016-2017г. Так, изоляты A/mute swan/Kazakhstan/1-267-20-B/2020 (H5N8), A/barnacle goose/Germany-SH-AI02167/2020 (H5N8), A/chicken/England/030720/2020 (H5N8), A/chicken/Netherlands/20016597-026030/2020 (H5N8), A/goose/Omsk/1521-1/2020, A/duck/Saratov/1578-2/2020, A/duck/Chelyabinsk/1207-1/2020 (H5N8) формируют очень гомогенную группу, распространение которой очевидно связано с миграцией диких птиц. Можно отметить, что изоляты A/domestic duck/Poland/285/2020 (H5N8) и A/Mandarinduck/Korea/H242/2020 (H5N8), выделенные на территории сопредельных стран, демонстрируют большие различия. Интересно выявление изолята A/goose/Tatarstan/1730-2/2020 (H5N8), демонстрирующего высокое сходство с изолятами ВГ подтипа, выявленных в 2017 г. в Воронеже, Москве, Бельгии.

Выполнен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена НА изолятов ВГП. Максимальный уровень различий нуклеотидной последовательности гена НА внутри группы 8С.4 составил 9%. Отличие между изолятами,

выделенными в РФ в диапазоне 0,3-3%. Наибольший процент различий нуклеотидной последовательности внутри этой группы имели изоляты A/goose/Omsk/1521-1/2020, A/duck/Saratov/1578-2/2020 и A/duck/Chelyabinsk/1207-1/2020 – 3%; между собой отличие составило 0,3%. Различия нуклеотидной последовательности изолятов группы 8С.4 от изолята A/mallard/Krasnoyarsk/436/11 (H3N8) составил 17%.

### **3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

#### **3.1 Выводы**

1. Разработаны методы выявления РНК вирусов гриппа птиц подтипов N2 и N8 с помощью ОТ-ПЦР-РВ, аналитическая чувствительность которых составляет 1,2-3,2 lg ЭИД50/см<sup>3</sup> и 1,95-3,45 lg ЭИД50/см<sup>3</sup>, соответственно. Методы использованы для выявления генетического материала вирусов подтипа N2 в 61 пробе, N8 – в 201 пробе в период с 2018 по 2020 гг., полученном из 24 регионов Российской Федерации при подозрении и вспышках гриппа птиц.
2. Разработаны методы определения нуклеотидной последовательности гена нейраминидазы вирусов гриппа птиц подтипов N2 и N8 в ОТ-ПЦР. Схема амплификации включает гнездовой вариант ПЦР, что позволяет использовать РНК вируса, выделенную непосредственно из проб биологического материала.
3. Определены нуклеотидные последовательности гена нейраминидазы 7 изолятов подтипа N2 и 9 изолятов подтипа N8, в том числе из биоматериала, полученного из очагов болезни. Нуклеотидные последовательности оригинальных генов NA вирусов опубликованы в базах данных GenBank и GisAID.
4. В результате филогенетического анализа по гену нейраминидазы установлено, что вирусы гриппа птиц подтипа N2, выделенные на территории страны, относятся к трем генетическим группам (2А.1, 2А.1.2 и 2А.2). Анализ аминокислотной последовательности вирусов гриппа птиц подтипа N2, использованных в работе, показал наличие делеций в участке «стебля» нейраминидазы. Варьирование размеров вирусной нейраминидазы свидетельствует о потенциальном разнообразии тропных свойств вируса и его способности к межвидовой передаче и проникновению в популяции птиц.
5. Вирусы подтипа N8, выделенные на территории Российской Федерации, относятся к двум генетическим группам (8С.3 и 8С.4). Относительно высокий уровень отличий внутри группы 8С.4 среди изолятов выделенных в 2020 г. указывают на дальнейшую эволюцию вируса гриппа в популяциях птиц.

**3.2 Практические предложения.** Для практического использования предлагаются методические рекомендации, разработанные при выполнении научных исследований по теме диссертации: «Методические рекомендации по выявлению РНК

вируса гриппа птиц подтипа N2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени»; «Методические рекомендации по выявлению РНК вируса гриппа птиц подтипа N8 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени»; «Методические рекомендации по определению первичной структуры гена NA изолятов вируса гриппа птиц подтипа N2 с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования»; «Методические рекомендации по определению первичной структуры гена NA изолятов вируса гриппа птиц подтипа N8 с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования».

Методические указания могут быть использованы для определения первичной структуры гена NA ВГП подтипов N2 и N8.

#### **4. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Выбор олигонуклеотидных праймеров и оптимизация постановки ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипа N8 / П.Б. Акшалова [и др.] // Достижения молодых ученых - в ветеринар. практику: материалы 5-й Междунар. науч. конф. - Владимир, 2019. - С. 77-83.
2. Выбор олигонуклеотидных праймеров и оптимизация постановки ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипа N2 / П.Б. Акшалова, Л.О. Щербакова, А.В. Андриясов [и др.] // Проблемы теории и практики современной ветеринарной науки: сборник научных трудов посвящен 90-летию со дня рождения академика НАН РК З.К.Кожебекова – Алматы, 2019. – Т.65. - С.184-191.
3. Разработка метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипа N2 / П.Б. Акшалова, А.В. Андриясов, Л.О. Щербакова [и др.]// Ветеринария сегодня. – 2020. - №3 (34). - С. 186–192. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-186-192.
4. Анализ генетических свойств изолята вируса гриппа A/Chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2, выделенного на территории Челябинской области / Н.Г. Зиняков, О.С. Осипова, П.Б. Акшалова [и др.] // Ветеринария сегодня. - 2019. - №4 (31). - С. 49-53. DOI:10.29326/2304-196x-2019-4-31-49-53.
5. Акшалова П.Б., Чвала И.А. Разработка метода идентификации вируса гриппа птиц подтипов N2 и N8 с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени// Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020: сборник материалов под ред. В.Г. Акимкина, М.Г. Твороговой. – М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2020. - С. 45.
6. Выделение и изучение изолятов вируса гриппа птиц подтипа H9N2 на территории РФ в 2018-2020 гг. / О.С. Осипова, В.Ю. Сосипаторова, Н.Г.Зиняков, П.Б. Акшалова, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала // Проблемы теории и практики современной ветеринарной науки: сб. научных трудов посвящен 115-летию Казахского научно-исследовательского ветеринарного института. – Алматы, 2020. – Т.66. - С.76 - 82.