



На правах рукописи

Ли Синьсинь

БИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСОВ
ГРИППА А, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДИКИХ ПТИЦ ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ В 2014-2018
ГОДАХ

03.02.02 – Вирусология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ)

Научный руководитель	Шестопалов Александр Михайлович доктор биологических наук, профессор
Официальные оппоненты:	Ленёва Ирина Анатольевна доктор биологических наук, профессор , заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно- исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»;
	Ломакина Наталья Фёдоровна кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации»
Ведущая организация	ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»

Защита диссертации состоится 08 июня 2021 г. в 13 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» по адресу: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ».

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г.Владимир). Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Автореферат разослан _____ 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы Вирусы гриппа принадлежат семейству ортомиксовирусы (*Orthomyxoviridae*), которое разделяется на основании антигенных различий в их нуклеопротеидном (NP) и матричном (M) белках, на следующие роды: Influenzavirus A, Influenzavirus B и Influenzavirus C (Lamb et al., 1898). Из них только вирус гриппа А (ВГА) является наиболее патогенным и инфицирует разные виды животных, включая морских млекопитающих, лошадей, свиней и птиц, периодически вызывая опустошительные пандемии в человеческой популяции. Все известные вирусы птичьего гриппа относятся к типу А.

К настоящему моменту среди птиц обнаружено 16 субтипов НА и 9 субтипов NA. Кроме того, два новых субтипа ВГА (H17N10 и H18N11) были выделены у летучих мышей (Tong S et al., 2012; Tong S et al., 2013). Среди домашних птиц более распространены такие субтипы, как H5, H7, H9, H3, H4 и H6 (Guan Y et al., 2002; Chen H et al., 2004; Ge F et al., 2009); в т.ч. субтипы H5, H7 и H9 наиболее актуальны для домашнего и промышленного птицеводства. В последние годы вирус гриппа субтипов H5 и H7 стал чаще инфицировать людей и даже приводить к их смерти. Кроме того, появился новый высокопатогенный субтип H7, который нанес серьезный социально-экономический ущерб. Эпизоотологический и эпидемиологический надзор при гриппе в разных странах стал основой его профилактики.

Водоплавающим околотовным птицам принадлежит основная роль в поддержании циркуляции ВГА в диких биоценозах, среди которых инфекция передаётся фекально-оральным способом, вызывая обычно легко протекающую болезнь. Обширный ареал обитания этих птиц и слабовирулентная природа инфекции у них обеспечивают циркуляцию ВГА птиц в природных условиях. Некоторые виды диких уток могут быть носителями вируса гриппа H5 субтипа до трёх недель (Fouchier et al., 2003).

Одной из основных причин широкого распространения вируса птичьего гриппа среди птиц является массовая миграция диких водоплавающих птиц (Campitelli et al., 2006; Smith et al., 2006). Дикие водоплавающие птицы являются носителями вируса птичьего гриппа, и почти все его субтипы могут быть изолированы от них. Это создает хорошую основу для горизонтального распространения вируса. При крупномасштабной миграции дикие водоплавающие птицы подвергаются более широкому непосредственному контакту с другими домашними птицами и даже другими млекопитающими, что значительно

увеличивает масштабы и вероятность распространения вируса птичьего гриппа, а также создает серьезные проблемы для профилактики и контроля заболеваний. Кроме того, разведение домашних птиц и циркуляция продуктов птицеводства также являются одними из основных факторов передачи вирусов птичьего гриппа.

На севере России располагаются главные места гнездования многих мигрирующих птиц отрядов гусеобразные. Особую важность представляет территория Западно-Сибирской равнины (Gilbert et al., 2006). Юг Западной Сибири, богатый реками и озёрами (долины рек Оби и Иртыша, Обь-Иртышское междуречье), находится на путях миграции многих видов птиц и является гнездовым ареалом большого числа видов, экологически связанных с водоёмами. Самое крупное из озёр этого региона - оз.Чаны, известное как место массовых скоплений птиц не только в гнездовой период, но и во время миграционных остановок (Юрлов, 1977). Территорию юга Западной Сибири пересекают западноазиатский-восточноафриканский, центрально-азиатский и восточноазиатский-австралийский перелётные пути, объединяя популяции птиц, зимующих в различных регионах мира (Юрлов, 1981).

Таким образом, все вышеизложенное указывает на важность изучения экологии вируса гриппа А на территории юга Западной Сибири, исследования его генетического разнообразия, а также изучения биологических свойств и филогенетических связей выделенных штаммов вируса. Результаты, полученные в ходе данной работы, помогут не только дополнить знания о генетике и эволюции вируса, но и исследовать пути распространения вируса и прогнозировать сценарии развития эпизоотической ситуации, а также определять возможные тенденции проявления эпизоотического и эпидемического потенциалов его различных субтипов.

Степень разработанности проблемы. Вопросы мониторинга вируса гриппа птиц, эволюционной изменчивости и генетического разнообразия этого возбудителя широко освещаются в работах отечественных и зарубежных авторов: Д.К. Львова, А.М. Шестопалов, К.А Шаршов, М.Ю. Щелканов, В.Д. Ильичев, Е.А. Смородинцевой, D.J. Alexander, R.A. Fouchier, R.G. Webster, R.A. Lamb, R.M. Krug, Y. Kawaoka, R. Donis, J.A. Belser, A.H. Reid, Y.-H. Bi, J.K. Taubenberger, Y. Sakoda, D. Smith, V.J. Munster, C. Brown, L.-X. Li, C. Scholtissek и многих других. Их работы в значительной мере способствовали изучению особенностей распространения нового возбудителя по всему миру, содержат подробный эпидемиологический анализ событий, как отдельных сезонов, так и общий анализ распространения и

циркуляции пандемического штамма. В этих работах рассмотрены основные свойства разных штаммов вируса гриппа, возможные факторы патогенности возбудителя, проведен детальный генетический анализ, позволяющий сопоставить штаммы с ранее циркулировавшими пандемическими и эпидемическими штаммами гриппа птиц, а также вирусами гриппа человека, свиней и других животных.

Однако в значительной части результаты этих исследований не достаточны для полной оценки биологического разнообразия ВГА, вирусоносительства различными видами диких птиц, а также эволюции патогена. В этой связи изучение перечисленных аспектов в дальнейшем позволит сформировать более полное представление о важности территории юга Западной Сибири в распространении вируса гриппа в Евразии и экологии этого патогена.

Цель и задачи исследования

Целью данного исследования является выявление биологического разнообразия и экологических особенностей вирусов гриппа А, выделенных от диких птиц юга Западной Сибири.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить биологическое разнообразие вариантов вируса гриппа А в популяциях диких птиц на территории юга Западной Сибири.
2. Выявить закономерности распределения вирусов гриппа А в различных таксономических группах птиц.
3. Изучить основные биологические свойства выявленных редких и уникальных вариантов вируса гриппа А.
4. Изучить фенотипические и молекулярно-генетические характеристики вариантов вируса гриппа А, выделенных на юге Западной Сибири.
5. Провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей областей генома выявленных штаммов вируса гриппа А с представленными в базе данных GenBank и GISAID;
6. Произвести филогенетический анализ полученных первичных последовательностей генов.

Научная новизна. В ходе данной работы получены современные данные о циркуляции вирусов гриппа А среди диких птиц на территории юга Западной Сибири в период с 2014 по 2018 гг. Всего было выделено и изучено 176 штаммов вируса гриппа А, относящихся к 9 субтипам.

Определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих 8 геномов 43 штаммов вируса гриппа А, выделенных на юге Западной Сибири.

Проведено их депонирование в базу данных GISAID и генетический анализ. Изучены их филогенетические отношения с другими штаммами, последовательности которых представлены в базе данных GenBank и GISAID.

Штаммы вирусов гриппа A/teal/Chany/324/2017(H12N5), A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8), A/mallard/Novosibirsk region/963k/2018(H3N2), A/mallard/Novosibirsk re-gion/957k/2018(H3N8), A/coot/Novosibirsk region/563k/2018(H3N8), A/shoveler/Novosibirsk region/999k/2018(H12N5), A/mallard/Novosibirsk re-gion/962k/2018(H12N5), APMV4/teal/Novosibirsk region/946k/2018, APMV4/mallard/Chany Lake/44/2018, APMV4/teal/Novosibirsk region/952k/2018 депонированы в государственную коллекцию возбудителей инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Впервые на территории России выделен вирус гриппа А с субтипом H6N8 (штамм A/gadwall/Chany/97/2016).

Также выделены такие варианты вируса гриппа, как низкопатогенные H5N2 и H12N5, данные о которых в исследуемом регионе мало изучены.

Теоретическая и практическая значимость. В ходе работы определены первичные структуры полных геномов вирусов гриппа А, изолированных на юге Западной Сибири. Эти последовательности являются важным дополнением к существующему пулу известных геномов вирусов гриппа и, благодаря размещению в открытой международной базе данных GISAID, включаются в глобальную картину эволюционной изменчивости вирусов гриппа, циркулировавших в популяции диких птиц.

Штаммы вирусов гриппа, полученные в ходе данной работы, могут быть использованы в диагностических целях в качестве антигенов и полученных на основе данных антигенов поликлональных сывороток.

Новые данные, характеризующие биологическое разнообразие вирусов гриппа, циркулирующих у диких птиц Юга Западной Сибири, а также ряд их молекулярно-биологических свойств и особенностей полных геномов, открывают дополнительные возможности углубленного изучения экологии патогена и его эволюции, в том числе в направлении расширения эпизоотического и эпидемического потенциала и изыскания механизмов его прогностической оценки.

Методология и методы исследования. Методология проведенных исследований включает: биоинформатические методы; вирусологические (вирусовыделение, титрование вируса); молекулярно-биологические (ПЦР-РВ, секвенирование); серологические; клеточной биологии и другие методы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В период с 2014 по 2018 г. на территории юга Западной Сибири было собрано 1924 образца у диких птиц, относящихся к 7 отрядам, из которых выделено 176 изолятов вируса гриппа. Наиболее распространенным субтипом вируса является H3N8.

2. Впервые в Российской Федерации выделены вирусы гриппа А с субтипом H6N8 (штамм A/gadwall/Chany/97/2016), установлены его основные молекулярно-биологические свойства.

3. По данным филогенетического анализа, штаммы A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8), A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3), A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3) и A/gadwall/Chany/315/2016 (H1N1) относятся к Евразийской генетической линии вируса птичьего гриппа А.

4. Дикие водоплавающие птицы, как важнейшие носители ВГА, играют важную роль не только в поддержании циркулирующего вируса в природе, но и в высоком генетическом разнообразии вируса.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на следующих конференциях: 54-й Международной научной студенческой конференции (г. Новосибирск, 2016г.), 55-й Международной научной студенческой конференции (г. Новосибирск, 2017г.), 56-й Международной научной студенческой конференции (г. Новосибирск, 2018 г.), 58-й Международной научной студенческой конференции (г. Новосибирск, 2020г.), XX Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий» (г.Новосибирск, 2015 г.), Всероссийской конференции с международным участием «Биогеосистемная экология и эволюционная биогеография» (г.Новосибирск, 2015г.), 13th China Ornithological Conference (г. Хэфэй, 2015г.), Conference «Transmission of respiratory viruses: from basic science to evidence based options for control» (г. Гонконг, 2017 г.).

Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликованы 3 статьи: в том числе 2 статьи - в российском журнале, входящем в перечень рецензируемых и рекомендованных ВАК Минобрнауки России; 1 статья - в зарубежном научном издании и 10 тезисов в сборниках научных конференций различного уровня.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 125 страницах компьютерного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, заключение, список

литературы и приложения.

Диссертация иллюстрирована 6 таблицами и 20 рисунками. Список литературы включает 213 источников, в том числе 209 работ зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследования

Исследование биологического разнообразия ВГА у диких птиц на территории юга Западной Сибири было проведено с 2014 по 2018 гг. Ежегодно в период весенней и осенней миграции диких птиц мы осуществляли экспедиционные выезды с целью сбора биологического материала. Мазки брали ватными палочками и устанавливали в подготовленные пробирки со стерильной средой. Пробирки с транспортной средой хранили в холодильных камерах (4°C) или при комнатной температуре не более двух суток.

Выделение изолятов ВГА из клоакальных смывов птиц проводили на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) путем 3 последовательных пассажей согласно методике ВОЗ (WHO, 2002).

Наличие вируса в аллантоисной жидкости определяли в реакции гемагглютинации (РГА) по стандартной методике, рекомендованной ВОЗ (WHO, 2011).

Выделение РНК производил коммерческим набором QIAamp®Viral RNA MiniKit согласно соответствующей методике.

Постановку реакции осуществляли с помощью коммерческого набора «РЕВЕРТА-L» («АмплиСенс», Россия) согласно инструкции производителя.

Постановку ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени для выявления вируса гриппа типа А на амплификаторе IQCycler (BioRad, США) проводили с использованием набора Quick-Load Taq 2X Master Mix (BioLabs, Великобритания) и специфических праймеров.

Определение субтипов выделенных изолятов вируса гриппа производили на основе выяснения первичных структур генов HA и NA. Для этого были получены полноразмерные копии генов с использованием коммерческого набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

Для индикации результатов амплификации проводили электрофоретическое разделение продуктов ОТ-ПЦР в 1.5% агарозном геле в 1xTAE буфере. ДНК визуализировали после окраски бромистым этидием при освещении УФ-светом. Длину фрагментов продуктов реакции определяли в сравнении с используемым ДНК- маркером (Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Литва). Элюцию

фрагментов ДНК из геля производили коммерческим набором QIAquick Gel Extraction Kit (Quagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

Реакцию секвенирования проводили с использованием набора «BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit» (Applied BioSystems, США), а анализ продуктов на автоматическом секвенаторе 3130xl Genetic analyzer.

Аллантоисную жидкость, подготовленную по описанной методике, отправляли в ЦКП ИФМиХБ для полногеномного секвенирования. Филогенетические деревья выровненных нуклеотидных последовательностей строили с помощью программы MEGAX методом «максимального правдоподобия (n=1000) (Maximum-Likelihood, ML) (Saitou, 1990).

Определение вирусных титров из стоков вирусов проводили в РКЭ согласно рекомендациям ВОЗ (WHO, 2011). Летальность определяли по стандартной методике (WHO, 2011).

Для определения патогенности штамма ВГА проводили расчет IVPI-индекса (Intravenous Pathogenicity Index). За зараженными 6-недельными SPF-цыплятами породы Род Айленд наблюдали в течение 10 дней и регистрировали проявление клинических признаков заболевания или смертность (WHO, 2002).

2.2 Результаты исследования

Результаты мониторинга вируса гриппа А у диких птиц юга Западной Сибири. Исследование биологического разнообразия ВГА у диких птиц на территории юга Западной Сибири было проведено в период 2014-2018 гг. Всего было собрано 1924 образца от диких птиц 7 отрядов: гусеобразные, ржанкообразные, воробьинообразные, аистообразные, журавлеобразные, поганкообразные, пеликанообразные (Таблица 1). Основное количество особей составили птицы двух отрядов – гусеобразные и журавлеобразные. Процентное соотношение количества особей птиц данных отрядов составило от общего числа 80.98% и 16.27%, соответственно. На долю остальных 5 отрядов птиц пришлось только около 2.75% образцов.

Наибольшее количество исследованных птиц относится к отряду гусеобразные и в основном представлено видами диких уток, такими как чирок-трескунок, чирок-свистунок, нырок красноголовый, кряква, серая утка и широконоска. Данные виды птиц являются наиболее распространенными на территории юга Западной Сибири и мигрируют в регион с целью гнездования, как основной природный резервуар ВГА.

Таблица 1 - Видовая характеристика и количество исследованных диких птиц юга Западной Сибири

Отряд	Вид	2014г.	2015г.	2016г.	2017г.	2018г.	Всего особей данного вида
Гусеобразные	Чирок-свистунок (<i>Anas crecca</i>)	34	41	33	66	86	260
	Чирок-трескунок (<i>Anas querquedula</i>)	52	25	14	50	41	182
	Кряква (<i>Anas platyrhynchos</i>)	29	22	65	71	51	238
	Широконоска (<i>Anas clypeata</i>)	42	46	10	17	46	161
	Красноголовый нырок (<i>Aythya ferina</i>)	35	64	34	104	19	256
	Шилохвость (<i>Anas acuta</i>)	8	12	3	18	53	94
	Серая утка (<i>Anas strepera</i>)	18	63	79	30	55	245
	Савка (<i>Oxyura leucocephala</i>)	1	0	0	0	0	1
	Хохлатая черныш (<i>Aythya fuligula</i>)	4	3	12	3	5	27
	Обыкновенный гоголь (<i>Vesphala clangula</i>)	4	10	14	0	8	36
	Большой крохаль (<i>Mergus merganser</i>)	0	0	0	0	2	2
	Крохаль малый (<i>Mergullus albellus</i>)	2	0	4	0	0	6
	Связь (<i>Anas penelope</i>)	0	7	7	2	7	23
	Лебедь-шипун (<i>Cygnus olor</i>)	0	2	0	1	1	4
	Лебедь-кликун (<i>Cygnus cygnus</i>)	0	0	1	0	0	1
Красноносый нырок (<i>Netta rufina</i>)	0	3	10	2	7	22	
Ржанкообразные	Большой веретенник (<i>Limosa limosa</i>)	1	0	0	0	0	1
	Чайка озерная (<i>Larus ridibundus</i>)	0	0	2	0	0	2
	Хохотун черноголовый (<i>Larus ichthyaetus</i>)	0	0	0	1	2	3
	Барабинская чайка (<i>Larus barabensis</i>)	0	0	0	0	3	3
	Бекас (<i>Gallinago gallinago</i>)	0	2	0	0	0	2
Журавлеобразные	Лысуха (<i>Fulica atra</i>)	31	51	110	45	76	313
Поганкообразные	Черношейная поганка (<i>Podiceps nigricollis</i>)	1	1	0	0	0	2
	Серошекая поганка (<i>Podiceps grisegena</i>)	0	0	0	0	1	1
	Большая поганка (<i>Podiceps cristatus</i>)	0	9	4	2	5	20
Аистообразные	Серая цапля (<i>Ardea cinerea</i>)	2	1	0	1	1	5
Воробьинообразные	Просьяная камышовка (<i>Acrocephalus sorghophilus</i>)	0	2	0	0	0	2
Пеликанообразные	Большой баклан (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	0	7	0	2	3	12
Всего за пять лет		264	371	402	415	472	1924

Собранный биологический материал исследовали на наличие ВГА с использованием стандартных методик, рекомендованных ВОЗ (WHO, 2012). В ходе данной работы было выделено 176 штаммов ВГА. Методом ОТ-ПЦР с последующим определением нуклеотидных последовательностей, нами были определены субтипы 43 штаммов. Изоляты ВГА были выделены от птиц водно-болотной экологической группы, относящихся к отрядам гусеобразные, ржанкообразные, журавлеобразные и поганкообразные. Процент выделения вируса гриппа от отряда гусеобразные составил 10.72% (167/1588), что является самым высоким показателем выделения среди всех отрядов. Среди птиц отряда гусеобразные, от которых был выделен ВГА, доминируют чирок-свистунок, широконоска, шилохвость и чирок-трескунок, процент выделения составил 19.6%, 13%, 12.8% и 12.6%, соответственно. Также вирус был выделен от птиц видов кряква, серая утка, хохлатая чернеть, нырок красноголовый и свиязь.

У изолятов вируса были установлены следующие субтипы: H1N1 (n=1), H2N1 (n=1), H3N8 (n=25), H2N3 (n=2), H4N6 (n=3), H5N3 (n=7), H6N8 (n=1), H5N2 (n=2), H12N5 (n=1). Таким образом, результаты эпиднадзора за птичьим гриппом на юге Западной Сибири с 2014 по 2018 год показывают, что H3N8 является доминирующим субтипом, на его долю приходится 58.14% (25/43) от общего числа изолятов вируса в данном регионе. В то же время, из общего числа изолятов вируса субтипы H12N5 и H6N8 были выделены в единичных случаях, а H6N8-субтип был выделен в Российской Федерации впервые.

Результаты наших исследований показывают, что основную роль в поддержании циркуляции ВГА в природе играют птицы водно-болотной группы, а именно птицы отряда гусеобразные. Все штаммы ВГА, выделенные в данной работе, были обнаружены в образцах, собранных от диких птиц в осенний период.

Молекулярно-генетический и филогенетический анализ вируса птичьего гриппа штамма A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8). В данной работе проведен анализ генной последовательности штамма вируса субтипа H6N8 (штамм A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8)), выделенного от дикой птицы на озере Чаны осенью в 2016 году. Штамм A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) является единственным известным штаммом вируса гриппа субтипа H6N8, выделенным на территории России. В ходе исследований были получены первичные структуры всех восьми сегментов штамма A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) и задепонированы в международную базу данных Genbank (номера EPI925949, EPI925950, EPI925951,

EPI925952, EPI925953, EPI925954, EPI925955, EPI925956). Затем эти нуклеотидные последовательности сравнили с гомологичными ВГП из международной базы данных GISAID. Результаты показали, что восемь генных сегментов данного вируса содержат полные открытые рамки считывания вирусных генов и имеют самую высокую идентичность с субтипами вирусов птичьего гриппа из Монголии, Нидерландов, Бангладеш, Китая и Грузии (Таблица 2).

Ранее выделенные на Тайване вирусы субтипа H6N1, приведшие к гибели домашних птиц и заболеванию нескольких человек, исследовали на 6-недельных цыплятах на патогенность. Результаты теста показали, что за все время наблюдения (14 дней) ни одна экспериментальная птица не заболела и не погибла. Выделенный вирус оказался не патогенным, в соответствии с классификацией МЭБ, его индекс патогенности равен нулю (IVPI=0).

Таблица 2 - Генетическая идентичность штамма A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) другим штаммам ВГП, выделенным от птиц

Сегмент гена	Accession No. ^a	Наиболее гомологичный штамм ^b	Процент гомологии (%)
PB2	LC121449	A/duck/Mongolia/769/2015(H4N6)	98.9
PB1	KX979830	A/mallar duck/Netherlands/20/2011(H6N8)	98.5
		A/black-tailed	
PA	KY635496	godwit/Bangladesh/24734/2015(H7N5)	99.0
HA	KU143276	A/wild bird/Wuhan/CDHN15/2015(H6N2)	98.1
		A/mallard duck/Netherlands/7/2014	
NP	KX978311	(H6N2)	98.6
		A/mallard duck/Netherlands/17/2011	
NA	KX978560	(H3N8)	98.1
M	MF682900	A/mallard duck/Georgia/1/2014(H10N7)	98.9
NS	MF147859	A/mallard duck/Georgia/11/2011(H1N1)	99.1

Примечание: а - номера доступа DDBJ/EMBL/GenBank, представленные в исследовании; b - в таблице показаны вирусы гриппа с наивысшей степенью идентичности нуклеотидной последовательности, основанные на данных BLAST-анализа нуклеотидов в базе GenBank

В антигенном сайте расщепления белка HA штамм A/gadwall/Chany/97/2016 (H6N8) имеет аминокислотную последовательность PQIETR↓GLF, которая содержит только одну щелочную аминокислоту, что соответствует молекулярным характеристикам низкопатогенного вируса птичьего гриппа. По прогнозу программы NetNGlyc 1.0 Server аминокислотная последовательность белка HA1 имеет четыре потенциальных сайта N-гликозилирования, а именно -NST-, -NVT-, -NNT- и -NKT-, которые расположены в позициях 27, 39, 182 и 306. В области HA2

расположены два сайта N-гликозилирования -NGT- и -NGS-, в позициях 498 и 557. Результаты филогенетического анализа последовательности гена НА штамма вируса A/gadwall/Chany/97/2016 (H6N8) указывают на то, что исследованный штамм относится к Евразийской генетической линии и филогенетически наиболее близок к гену НА вируса штамма A/duck/Bangladesh/25767/2015 (H6N1) (Рисунок 1).

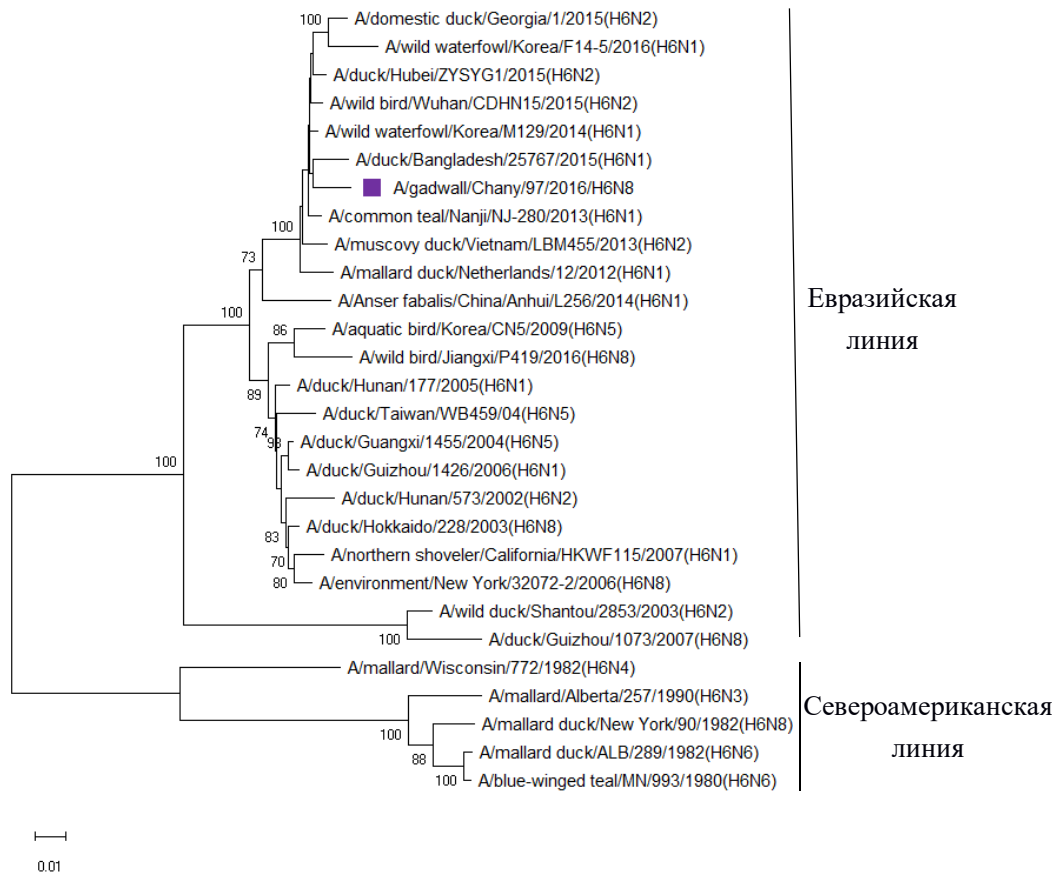


Рисунок 1. Филогенетическое дерево гена НА штамма ВГА
A/gadwall/Chany/97/2016 (H6N8)

* ■ штамм, изученный в нашем исследовании

Результаты анализа показывают, что ген НА имеет 6 сайтов гликозилирования в позициях 46, 54, 67, 84, 144 и 293, которые представляют собой -NET-, -NET-, -NTS-, -NNT, -NGT- и -NWT-, соответственно. Согласно филогенетическому анализу по гену НА исследованный штамм находится в одном кладе со штаммами A/Duck/China/R095/2014 (H6N8) и A/mallard/Jiangxi/G98/2014(H3N8) из Китая, с высокой идентичностью нуклеотидной последовательности от 97.6% до 98.0%.

Таким образом, при проведении планового мониторинга вируса гриппа птиц на юге Западной Сибири нами был выделен и проанализирован уникальный

(единственный) для России вариант гриппа птиц – субтип H6N8. Выделенный изолят был всесторонне изучен и задепонирован в коллекцию как штамм A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8). Выделенный вирус оказался непатогенным. По результатам проведенного филогенетического анализа генов HA и NA штамма (A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8)) можно заключить, что исследуемый штамм, выделенный от серой утки на территории России в 2016 году, филогенетически наиболее близок штаммам, выделенным в Китае и Бангладеш и принадлежит к Евразийской генетической линии.

Молекулярно-генетический и филогенетический анализ вируса птичьего гриппа штаммов A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) и A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3).

В 2014 г. на территории юга Западной Сибири было выделено 2 изолята ВГА H5N3 субтипа (A/mallard/Chany/126K/2014 и A/mallard/Chany/260U/2014) от птиц вида кряква. Субтип выделенных изолятов был определен путем получения первичных структур генов HA и NA. Выделенные нами штаммы ВГА A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) и A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3) исследовали на патогенность путём внутривенного заражения кур. В течение 21 дня наблюдения клинические признаки инфекции (IVPI=0) не были обнаружены.

Анализ аминокислоты специальных сайтов показал, что аминокислотная последовательность на сайте расщепления белка HA двух штаммов вируса представляла собой PQRETR↓GLF. Согласно анализу NetNGlyc 1.0 Server, аминокислотная последовательность белка HA изолятов A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) содержит 7 потенциальных сайтов гликозилирования, которые расположены в сайтах 27 (NST), 39 (NVT), 181 (NNT), 209 (NPT), 302 (NSS), 496 (NGT) и 555 (NGS). Аминокислотная последовательность белка HA изолята A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3) имеет 6 потенциальных сайтов гликозилирования, отсутствует позиция 302 (NSS) по сравнению с A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3), остальные сайты идентичны. Филогенетическое дерево гена HA показывает, что два штамма вируса принадлежат к Евразийской генетической линии. Филогенетически A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) и A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3) наиболее близки и находится в одном кладе (Рисунок 2). Они тесно связаны с генами HA двух утиных H5N7 и H5N2 субтипов ВГП, выделенных в Монголии в 2014 году. На филогенетическом дереве гена NA A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) и

A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3) также находятся в одной ветке, они также наиболее схожи со штаммами A/tufted duck/Georgia/1/2012(H2N3) и находятся в одном кладе.

Таким образом, полученный результат свидетельствует о близком антигенном родстве изучаемых штаммов между собой и принадлежности данных штаммов к Евразийской генетической линии. Оба штамма являются низкопатогенными.

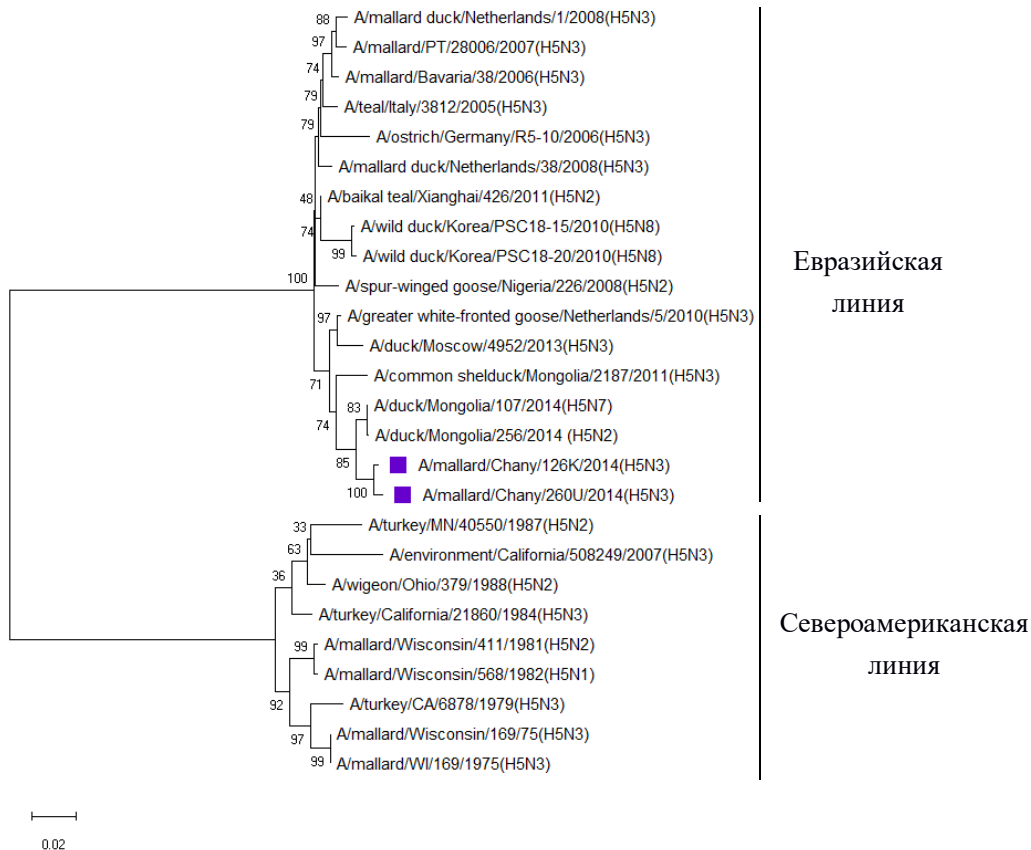


Рисунок 2. Филогенетическое дерево гена HA штаммов A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) и A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3)

* ■ штаммы, изученные в нашем исследовании

Анализ последовательности и филогенетических связей генов (PB2, PB1, PA, NP, M и NS) у выделенных штаммов вируса гриппа А Н6N8 и Н5N3

Проанализировали генетические и биологические характеристики генов PB2, PB1, PA, NP, M и NS, выделенных из трех штаммов вируса гриппа (штаммы A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8), A/mallard/Chany/126K/2014 и A/mallard/Chany/260U/2014)).

Гены PB2, PB1, PA, NP, M и NS трех исследуемых штаммов вируса демонстрируют значительное генетическое разнообразие с высокой идентичностью нуклеотидной последовательности различных субтипов ВГП, таких как H5N3, H6N8, H3N6, H5N8, H7N7, H1N1, H3N8 и H5N2 в базе данных NCBI. Гены (PB2, PB1, PA, NP, M и NS) трех вирусов птичьего гриппа в данном исследовании имеют относительно высокую идентичность друг с другом. Идентичность нуклеотидной последовательности гена PB2 трех вирусов птичьего гриппа составляет от 84.1% до 99.0%, идентичность нуклеотидной последовательности PB1 – от 87.3% до 98.9%, идентичность нуклеотидной последовательности гена PA – от 88.7% до 99.8%, идентичность нуклеотидной последовательности гена NP – от 89.2% до 98.8%, идентичность гена M - от 89.9% до 99.0%, идентичность гена NS - от 71.4% до 98.5%.

Филогенетический анализ последовательности гена PB2 указывает на то, что все три изучаемых штамма принадлежат к Евразийской линии, которая может быть разделена на 5 групп. Среди них A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) и A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) находятся в одной группе, а A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3) - отдельно в другой группе. A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) с штаммом из базы A/chicken/Hubei/ZYSJF15/2016(H9N2) находится в том же кладе (идентичность нуклеотидной последовательности составила 99.0%). A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) находится в одном кладе с индийским штаммом A/teal/Egypt/MB-D-125OP/2015(H7N3). A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3) и A/duck/Bangladesh/24035/2014(H10N1) имеют наибольшее сходство.

Филогенетическое дерево гена PB1 показывает, что изучаемые штаммы находятся в Евразийской линии, которую можно разделить на 4 группы. Ген PB1 двух штаммов субтипа H5N3 находится в той же ветви и филогенетически близок к китайским штаммам A/chicken/Wuhan/WHJF/2014(H5N2) и A/wild bird/Wuhan/CDHN15/2015(H6N2). A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) находится в одной ветви с A/wild bird/Jiangxi/P419/2016(H6N8) и A/chicken/Taiwan/01174/2015(H5N3).

Филогенетический анализ показал, что гены PA трех изучаемых штаммов принадлежат к Евразийской линии: A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8), A/duck/Bangladesh/24035/2014(H10N1) и A/black-tailed godwit/Bangladesh/24734/2015(H7N5) имеют близкое родство с идентичностью 91.9% и 92%. Гены PA двух изучаемых субтипов H5N3 находятся в одной ветви

филогенетического дерева.

Анализ филогенетических связей генов NP трех исследуемых изолятов показал, что все вирусы принадлежат к евразийской линии: A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) и A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) находятся в одном большом кладе, и тесно связаны со штаммами из Ухани и Монголии, в то же время A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3) находится в одном кладе с A/duck/Korea/DY104/2007(H4N6).

Анализ филогенетических связей генов M трех вирусных изолятов показал, что они также относятся к Евразийской линии. A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) и A/duck/Vietnam/LBM533/2013(H3N6) имеют близкое родство, A/mallard duck/Netherlands/7/2014(H6N2) находятся в одном небольшом кладе, и в то же время A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3) и A/mallard/Republic of Georgia/13/2011(H6N2) тесно связаны между собой.

Филогенетический анализ генов NS трех вирусных изолятов показал, что данный ген может разделить на Евразийскую и североамериканскую линию. Среди них A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) и A/duck/Mongolia/211/2015(H3N8) имеют наиболее близкое родство; A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8), A/mallard duck/Georgia/11/2011(H1N1) и A/Environment/Jiangxi/22207/2014(H4N2) филогенетически наиболее близки; A/mallard/Chany/260U/2014 (H5N3) и A/environment/Kamchatka/23/2016(H13N8) имеют самые близкие связи.

Таким образом, гены PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M и NS трех исследуемых штаммов вируса демонстрируют значительное филогенетическое разнообразие. Филогенетический анализ этих генов установил наличие реассортации генов у штаммов A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3), A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) и A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3).

Анализ геномной последовательности ВГА субтипа H1N1. В данной работе выделен штамм, изолированный от серой утки, который был назван A/gadwall/Chany/315/2016 и идентифицирован как субтип H1N1. Методом RT-PCR амплифицировали его геномные фрагменты и определили нуклеотидные последовательности, а также сравнивали гомологию с соответствующими сегментами генов вируса свиного гриппа и вируса сезонного человеческого гриппа, а затем провели филогенетический анализ, для определения связи между этими сегментами. Полная последовательность 8 генов зарегистрирована в базе данных GISAID, ее регистрационные номера: EPI925989 - EPI925996.

Общая длина гена PB2 составляет 2341bp, кодирующая область: 28-2308, и всего кодируется 759 аминокислот. Филогенетический анализ указывает на то, что ген PB2 A/gadwall/Chany/315/2016(H1N1) находится в линии евразийского птичьего гриппа, и исследуемый штамм филогенетически близок штамму A/duck/Mongolia/837/2015(H1N1), при этом, идентичность нуклеотидной последовательности достигла 97.5%, а идентичность аминокислотной последовательности - 99.6%.

Общая длина гена PB1 составляет 2341bp, кодирующая область: 25-2298, кодируется 757 аминокислот. Филогенетический анализ показывает, что ген PB1 штамма A/gadwall/Chany/315/2016(H1N1) находится в Евразийской линии птичьего гриппа. Изучаемый штамм филогенетически схож со штаммом A/mallard duck/Netherlands/26/2014 (A/H1N1), идентичность нуклеотидной последовательности достигает 98%, а идентичность аминокислотной последовательности - 99.2% (рисунок 3).

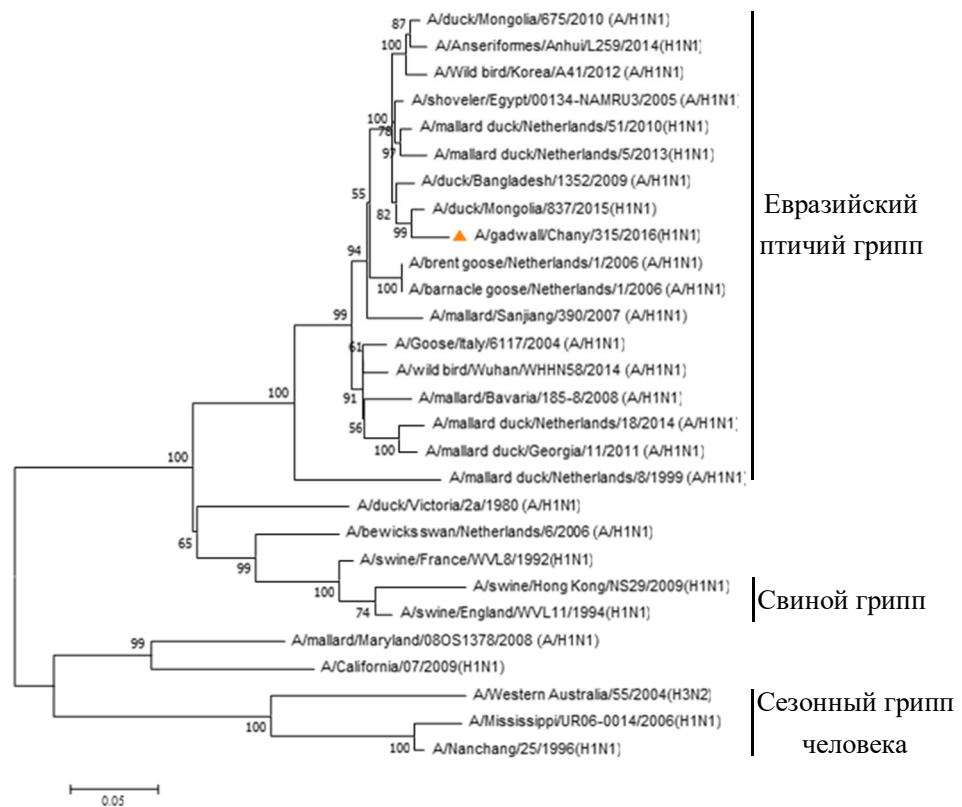


Рисунок 3. Филогенетическое дерево гена PB2 штамма A/gadwall/Chany/315/2016(H1N1)

* ▲ штамм, изученный в нашем исследовании

Длина гена PA составляет 2233bp, кодирующая область: 25-2175, кодируется 716 аминокислот. Филогенетический анализ указывает на то, что штаммы

A/gadwall/ Chany/315/2016(H1N1), A/mallard/Balkhash/6304_HA/2014(A/H1N1) и A/Mallard/Sweden/816/2014(A/ H1N1) имеют близкое сходство, и находятся в одной небольшой ветви, процент идентичности нуклеотидной последовательности между ними составляла 98.1% и 97.7%, а идентичность аминокислотной последовательности - 99.2% и 99.4%, и все они в евразийской линии птичьего гриппа.

Длина гена HA составляет 1777bp, кодирующая область: 33-1733, кодируется 566 аминокислот, нуклеотидная делеция отсутствует. Филогенетический анализ показывает, ген HA исследуемого штамма A/gadwall/Chany/315/2016(H1N1) принадлежит к Евразийской линии птичьего гриппа, со штаммами A/Anseriformes/Anhui/S107/2014(H1N1) и A/duck/ Hokkaido/W9/2015(H1N1) находится в одной ветви, идентичность нуклеотидной последовательности 98.1% и 97.9% , идентичность аминокислотной последовательности - 98.6% и 98.8%.

Длина гена NP составляет 1565bp, кодирующая область составляет 46-1542, кодируется 498 аминокислот. Филогенетический анализ указывает на то, что ген NP штамма A/gadwall/Chany/315/2016(H1N1) принадлежит к Евразийской линии птичьего гриппа. Данный штамм филогенетически схож со штаммами A/wild bird/Wuhan/WHN58/2014(A/H1N1) и A/duck/Fujian/JF47/2014 (A/H1N1), идентичность нуклеотидной последовательности между ними 99.1% и 98.7%, а идентичность аминокислотной последовательности - 99.6% и 99.8%. Аминокислотная идентичность штаммов A/кряква/Нидерланды/18/2014 (A/H1N1), A/кряква/Sanjiang/390/2007(A/H1N1) и A/кряква/Нидерланды/10-Cam/1999 (A/H1N1) достигает 100%.

Полная длина гена NA составляет 1458bp, кодирующая область: 21-1430, кодируется 469 аминокислот без делеции. Филогенетический анализ показывает, что ген NA штаммов A/gadwall/Chany/315/2016 (H1N1) и A/duck/Fujian/JF47/2014(A/H1N1) филогенетически схожи и принадлежат к Евразийской линии птичьего гриппа, идентичность нуклеотидной последовательности достигает 96.5%, а идентичность аминокислотной последовательности - 98.3%.

Длина гена M составляет 1027bp, кодирующая область состоит из двух частей, кодирует белки M1 и M2. Филогенетический анализ показывает, что ген M штаммов A/gadwall/Chany/315/2016 (H1N1) и A/Anseriformes/Anhui/L25/2014(A/H1N1) филогенетически схожи и принадлежат к Евразийской линии птичьего гриппа, идентичность нуклеотидной последовательности достигает 98.3%.

Ген NS имеет полную длину 890bp, кодирующая область состоит из двух частей, которые соответственно кодируют белки NS1 и NS2. Всего закодировано 121 аминокислота. Филогенетический анализ указывает на то, что ген NS штаммов A/gadwall/Chany/315/2016 (H1N1) и A/greater white-fronted goose/Netherlands/4/2011 (A/H1N1) имеет более близкое родство, идентичность нуклеотидной последовательности - 98.9%.

Таким образом, исходя из результатов молекулярно-генетического и филогенетического анализов, штамм A/gadwall/Chany/315/2016(H1N1) генетически значительно отличается от циркулировавшего ранее вируса сезонного гриппа человека и свиного гриппа. Полученный результат свидетельствует о близком родстве изучаемого штамма со штаммами, выделенными на территории Китая и Нидерландов. С большой вероятностью можно предположить, что занос исследуемого штамма на территорию Западной Сибири произошел с Китая и Нидерландов за счет миграций диких птиц.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3.1 Выводы

1. В период с 2014 по 2018 г. на территории юга Западной Сибири было собрано 1924 образца у диких птиц, относящихся к 7 отрядам, из которых выделено 176 изолятов вируса гриппа. Охарактеризовано 43 штамма вируса гриппа, относящихся к 9 субтипам: H1N1, H2N1, H2N3, H3N8, H4N6, H5N3, H6N8, H5N2 и H12N5. Наиболее распространенным субтипом вируса является H3N8.

2. Вирус птичьего гриппа был изолирован из биоматериала от диких птиц, относящихся к 4 отрядам. При этом на отряд гусеобразные пришлось 10.72% выделенных вирусов из общего числа исследованных образцов от всех птиц, ржанкообразные – 9.09%, поганкообразные – 8.7%, журавлеобразные – 2.24%.

3. Впервые в России выделен вирус гриппа H6N8-субтипа. Филогенетический анализ двух сегментов генома (НА и NA) штамма A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) показал принадлежность вируса к Евразийским генетическим линиям вируса птичьего гриппа. Относясь к низкопатогенному варианту, этот вирус по некоторым характеристикам склонен к возможному более активному проявлению эпизоотического и эпидемического потенциала и в этой связи требует особого внимания.

4. Выделены два штамма вируса гриппа А H5N3 субтипа (A/mallard/Chany/126K/2014(H5N3) и A/mallard/Chany/260U/2014(H5N3)),

принадлежащих к Евразийской линии. Оба штамма являются низкопатогенными согласно анализу аминокислотной последовательности сайта разрезания геммаглютинаина PQRETR↓GLF, и показателя внутривенного индекса патогенности (IVPI=0), однако требуют внимания в отношении оценки тенденций эволюции в сторону высокопатогенных.

5. Гены PB2, PB1, PA, NP, M и NS трех исследуемых штаммов вируса субтипов H6N8 и H5N3 демонстрируют генетическое разнообразие с высокой идентичностью нуклеотидных последовательностей в сравнении с генами штаммов таких субтипов, как H5N3, H6N8, H3N6, H5N8, H7N7, H1N1, H3N8 и H5N2. Все гены этих трех изученных штаммов вируса птичьего гриппа имеют относительно высокую идентичность друг с другом.

6. Выделен один штамм вируса гриппа А H1N1 субтипа (A/gadwall/Chany/315/2016 (H1N1)), принадлежащий к Евразийской линии. Этот штамм является на данный момент низкопатогенным, согласно анализу аминокислотной последовательности сайта разрезания геммаглютинаина PSVQSR↓GLF.

7. Дикие водоплавающие птицы, как важнейшие носители ВГА, играют важную роль не только в поддержании циркулирующего вируса в природе, но и в высоком генетическом разнообразии вируса, что создает благоприятные условия для постоянного образования новых рекомбинантных вирусов и даже для возникновения некоторых штаммов вирусов высокопатогенного гриппа с расширением их эпизоотического и эпидемического потенциала. Перечисленные обстоятельства, в свою очередь, диктуют обязательную необходимость постоянных мониторинговых исследований, обеспечивающих возможность прогностической оценки этого потенциала.

3.2 Практические предложения

Результаты, полученные в ходе данной работы, могут быть использованы широким кругом вирусологов, молекулярных биологов, ветеринарных специалистов, экологов и студентов ВУЗов, а также специалистов в области организации и проведения противоэпизоотических мероприятий.

Штаммы вирусов гриппа, полученные в ходе данной работы, могут быть использованы в диагностических целях для приготовления антиген содержащих препаратов и получения диагностических поликлональных сывороток в целях дальнейшего применения в системе эпизоотологического мониторинга.

Полученные 43 нуклеотидные последовательности полных генов изученных штаммов вируса гриппа, зарегистрированные в международной базе данных GISAID, предлагается применять при конструировании праймеров и филогенетических исследований ВГА

Полученные данные о биологическом разнообразии выделенных штаммов вируса гриппа от водных млекопитающих могут быть использованы в изучении эволюции, экологии патогена и путей распространения вируса.

4. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Экологическое разнообразие диких птиц - естественного резервуара вируса гриппа А на юге Западной Сибири / К. А. Шаршов, **С. Ли**, А. К. Юрлов, А.М. Шестопапов // Юг России: экология, развитие. – 2016. – № 4. – С. 56-65.

2. Avian influenza virus ecology in wild birds of Western Siberia / К.А. Sharshov, А.К. Yurlov, **Х.-Х. Li**, W. Wang, L.-X. Li, Y.-H. Bi, W.-J. Liu, T. Saito, H. Ogawa, A. M. Shestopalov // Avian Research. – 2017. – Vol. 8, N 2. – P. 110-114.

3. Биологические свойства вируса гриппа H6N8-субтипа, выделенного от диких птиц на юге Западной Сибири / **Ли С.**, Дубовицкий Н.А., Дёрко А.А., Глуценко А.В., Соболев И.А., Друзьяка А.В., Меджидова М.М., Мусинова Э.М., Шаршов К.А., Шестопапов А.М. // Юг России: экология, развитие. 2021. Т.16, N 1. С. 45-52. DOI: 10.18470/1992-1098-2021-1-45-52.

Тезисы:

1) O.G. Kurskaya, К.А. Sharshov, **Х.-Х. Li**, L.-X. Li, А.М. Shestopalov. Avian influenza in wild birds: impact for human health. 13th China Ornithological Conference. 16-18 November 2015. China. – P. 98-99.

2) А.М. Shestopalov, К.А. Sharshov, M.V. Sivay, O.G. Kurskaya, A.Y. Alekseev, **Х.-Х. Li**, L.-X. Li, А.К. Yurlov. Rare subtypes of avian influenza viruses in western Siberia (Russia). 13th China Ornithological Conference. 16-18 November 2015. China. – P. 100.

3) Gulyaeva M.A., Sharshov K.A., **Xinxin Li**, Dubovitskiy N.A., Sobolev I.A., Kurskaya O.G., Murashkina T.A., Alekseev A.Yu., Shestopalov A.M. Avian Influenza Surveillance in Asian Russia: Novel HPAI H5N8 virus in 2016. Conference «Transmission of respiratory viruses: from basic science to evidence based options for control» 19-21 June 2017. Hong Kong. – P. 81. (Poster 301).

4) **Ли Синьсинь**. Экологическое разнообразие птиц-переносчиков вируса

гриппа на юге Западной Сибири. Всероссийская конференция с международным участием «Биогеосистемная экология и эволюционная биогеография». 14-19 декабря 2015г. Новосибирск. – С. 57.

5) **Ли Синьсинь.** Экологическое разнообразие птиц-переносчиков вируса гриппа на юге Западной Сибири. XX Международная экологическая студенческая конференция «Экология России и сопредельных территорий». 30 октября-1 ноября 2015г. Новосибирск. – С. 203.

6) **Ли Синьсинь.** Результаты мониторинга вируса гриппа в популяциях диких птиц Западной Сибири. 53-й международной научной студенческой конференции. 11-17 апреля 2015г. Новосибирск. – С. 159

7) **Ли Синьсинь.** Мониторинг вируса гриппа у птиц, обитающих в Новосибирской области, за период 2014-2015 гг. 54-й международной научной студенческой конференции. 16-20 апреля 2016г. Новосибирск. – С. 51.

8) **Ли Синьсинь.** Мониторинг вируса гриппа у диких птиц юга Западной Сибири. 55-й международной научной студенческой конференции. 16-20 апреля 2017г. Новосибирск. – С. 76.

9) **Ли Синьсинь.** Мониторинг вируса гриппа у птиц, обитающих на юге Западной Сибири за период 2014–2017 гг. 56-й международной научной студенческой конференции. 22-27 апреля 2018г. Новосибирск. – С. 101.

10) **Ли Синьсинь.** Вирусы гриппа типа А, циркулирующие у диких птиц юга западной Сибири в 2014-2018 годах. 58-й международной научной студенческой конференции. 2020г. Новосибирск. – С. 75.

Подписано в печать 08.04.2021г.

Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л.1.

Тираж 80 экз

Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ

«Федеральный центр охраны здоровья животных».