На правах рукописи

МУРАШКИНА
ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГРИППА А В ПОПУЛЯЦИЯХ ДИКИХ ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ НА ЗАПАДНОМ ПОБЕРЕЖЬЕ СРЕДНЕГО КАСПИЯ

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2025

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

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Шаршов Кирилл Александрович

Официальные оппоненты: **Ильичёва Татьяна Николаевна,**
доктор биологических наук, доцент, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», ведущий научный сотрудник отдела зоонозных инфекций и гриппа;

Шуляк Анна Федоровна,
кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН», ведущий научный сотрудник лаборатории вирусологии

Ведущая организация: **ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»**

Защита состоится « 26 » февраля 2025 г. в « 13-00 » часов на заседании диссертационного совета 24.1.211.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) по адресу: 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Краснообск, ул. Центральная, 7, СФНЦА РАН, а/я 463, тел/факс (383) 348-44-62, E-mail: ds.ievsidv@bk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Сибирской научной сельскохозяйственной библиотеке и на сайте СФНЦА РАН: https://sfsca.ru; автореферат размещен на сайте ВАК: https://vak.minobrnauki.gov.ru.

Автореферат разослан «____» _____ 202__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета А.В. Нефедченко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Вирус гриппа представляет собой один из наиболее известных патогенов, оказывающих значительное влияние на общественное здоровье и экономику всего мира. Он принадлежит к семейству Orthomyxoviridae и включает четыре отдельных рода: вирус гриппа A (Alphainfluenzavirus), вирус гриппа B (Betainfluenzavirus), вирус гриппа C (Gammainfluenzavirus) и вирус гриппа D (Deltainfluenzavirus) (A. D. Osterhaus et al., 2000). Из всех этих вирусов вирус гриппа А демонстрирует наибольшее эпидемиологическое значение, способствуя возникновению сезонных «вспышек» и пандемий (WHO, 2024). Вирус гриппа А характеризуется способностью инфицировать различные виды млекопитающих, включая лошадей, свиней, тюленей и птиц, что прежде всего приводит к эпизоотиям среди последних. Это наносит значительный экономический ущерб птицеводческой отрасли и может привести к массовому уничтожению поголовья домашней птицы (X. Li et al., 2018).

Дикие птицы, относящиеся к отрядам гусеобразных и ржанкообразных, представляют собой главный природный резервуар вируса гриппа А, при этом у них заболевание часто протекает бессимптомно, что способствует распространению инфекции во время миграции. Это подчеркивает важность эпизоотологического мониторинга данного вируса в дикой природе. Во время миграции разные экологические группы диких птиц перемещаются определенными маршрутами, выбирая благоприятные для жизни места, такие как речные долины и прибрежные зоны. При этом экологически неблагоприятные территории они преодолевают, часто на больших высотах.

Концентрация мигрирующих птиц в ограниченных областях создает идеальные условия для циркуляции вируса среди популяции. Контакты между изолированными популяциями происходят на путях миграции и в местах зимовки, что способствует географическому распространению различных штаммов вируса гриппа А (L. J. Chen et al., 2017, J. H. van der Kolk, 2019). ВГА классифицируются на субтипы по двум поверхностным гликопротеинам – гемагглютинину (HA) и нейраминидазе (NA). В настоящее время известно 18 субтипов гемагглютинина и 11 субтипов нейраминидазы, причем все 16 субтипов HA и 9 субтипов NA были выделены от диких птиц (Y. Kawaoka et al., 1990; C. Rohm et al., 1996, R. Fouchier et al., 2005). Субтип H17N10 и H18N11 был обнаружен только у летучих мышей (S. Tong et al., 2012).

Для эффективного контроля возбудителя необходимо систематическое наблюдение и анализ вариантов вируса, которые существуют в популяциях диких птиц. Все известные высокопатогенные штаммы вируса гриппа А относятся к одним из трех субтипов гемагглютинина: H5, H7 или H9 (Y. Bi et al., 2024). Поэтому в процессе мониторинга необходимо сосредоточиться на выявлении и анализе этих вирусных вариантов. Исследование генетических, патогенных и антигенных характеристик у субтипов H5, H7 и H9 поможет оценить риск эпизоотий и определить их полезность для диагностики соответствующего субтипа гриппа А.

Также вирусы гриппа птиц способны преодолевать барьеры между видами и передаваться людям. У вируса гриппа А наблюдается высокая скорость мутаций в геноме, что связано с процессом реассортации. Это явление может привести к возникновению особо опасных вариантов, способных инфицировать людей, таких как H5N1 (S. Ludwig et al., 1995, Korteweg and Gu, 2010). Согласно информации Всемирной организации здравоохранения (на 7 июня 2024 года), с 1 января 2003 года по настоящее время было зарегистрировано 889 случаев инфицирования людей вирусом гриппа птиц A/H5N1 в 23 странах мира. Из этого числа 463 случая закончились летальным исходом (ВОЗ, 2024).

Не менее важным является определение филогенетических связей штаммов, изолированных от птиц в различных регионах, что позволяет проследить пути географического распространения вируса в экосистемах и разработать превентивные меры против эпизоотий.

Известно, что вирус гриппа А распространён среди водно-болотных птиц, однако проводить мониторинг по всей территории их обитания не представляется возможным. Поэтому наиболее целесообразно сосредоточить усилия на контрольных исследованиях в местах массового скопления различных популяций водно-болотных птиц. Обеспечение эпизоотологического мониторинга гриппа птиц и улучшение профилактических мер становятся важными задачами, особенно в регионах, таких как западное побережье Среднего Каспия, где подобных работ ранее не проводилось.

Степень разработанности темы исследования

Вирус гриппа птиц представляет собой один из наиболее известных патогенов, которые оказывают значительное воздействие на здоровье населения и состояние мировой экономики. Его структура стала предметом активных исследований с первой половины 1970-х годов, что стало возможным благодаря современным молекулярно-биологическим методам. За это время хорошо изучены его особенности распространения в природе, вирусологические и биологические свойства, пути передачи и репродукции в клетках хозяина, а также различные методы диагностики. Однако, из-за высокой генетической изменчивости вируса гриппа птиц периодически возникают его новые пандемические варианты, способные вызывать вспышки среди домашней птицы или преодолевать межвидовой барьер.

Мониторинг вируса гриппа птиц позволяет получить данные о современном разнообразии вариантов, оценить вероятную тенденцию его эволюционных изменений, а также обеспечивает возможность изучения биологических свойств новых вариантов вируса гриппа А.

Существуют так называемые «горячие точки» (hotspot) для мониторинга вируса, где совокупность условий позволяет проводить раннее обнаружение новых патогенных вариантов и выявить максимальное генетическое разнообразие. Подобные «горячие точки» для вируса гриппа описаны для регионов Черного и Азовского морей Украины и водно-болотных угодий Грузии. Действительно, родственные сегменты генов были обнаружены в H7 AIV у крякв в Украине в 2014 году и Грузии в 2016 году (D. Muzyka et al., 2016; D. Venkatesh et al., 2018).

Экология вируса гриппа птиц, особенно в контексте миграции диких птиц, представляет собой важную область исследования, учитывая потенциальные рис-

ки для здоровья человека и животных. Каспийский регион, как ключевая зона миграции для многих видов водоплавающих птиц, играет значительную роль в распространении вирусов гриппа, однако до настоящего времени исследования этого аспекта оставались ограниченными. Тысячи перелетных птиц разделяют экологически разнообразную среду обитания в регионе Каспийского моря, где миграционные пути из Африки и Азии пересекаются с миграционными путями в Сибирь (M. Gulyaeva et al., 2018). Вместе с тем, Каспийский регион может быть недооценен с точки зрения его роли в распространении AIV и может представлять большой интерес в качестве возможного места остановки во время миграции, где различные штаммы AIV могут подвергаться реассортации.

Таким образом, не смотря на значительную изученность вируса гриппа в целом, анализ степени разработанности темы экологии вируса гриппа птиц и его генетического разнообразия по доступным источникам выявил, что исследования в Каспийском регионе оставались ограниченными. Наряду с многочисленными данными по другим регионам, таким как Казахстан, Грузия, Западная Сибирь, западное побережье Среднего Каспия, как ключевая территория для экологии диких птиц являлась неизученной в контексте представленности и обмена вирусами гриппа между различными популяциями водоплавающих. Эти факты подчеркивают новизну и актуальность данного исследования, а также необходимость постоянного наблюдения за вирусом гриппа в популяциях диких птиц Каспийского региона и потенциальными рисками для здоровья человека и домашних животных.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение генетического разнообразие и экологических особенностей циркуляции различных субтипов вируса гриппа А в популяциях диких птиц западного побережья Среднего Каспия.

Для достижения цели были поставлены **задачи:**

1. Провести отбор проб биологического материала от диких птиц на территории западного побережья Среднего Каспия за период 2017-2020 гг.

2. Осуществить диагностику, выделение и генотипирование вируса гриппа А; изучить вирусологические свойства и сформировать коллекцию штаммов.

3. Провести анализ экологических особенностей циркуляции вируса гриппа А среди диких птиц.

4. Установить последовательности генома выделенных изолятов вируса и провести анализ филогенетических связей сегментов генома вирусов.

5. Провести анализ аминокислотных замен в основных известных генетических маркерах биологических свойств редких субтипов вируса.

Научная новизна работы. Впервые проведен мониторинг вируса гриппа А среди популяции диких птиц на ключевых орнитологических территориях западного побережья Среднего Каспия, а также установлена совместная циркуляция вируса гриппа и парамиксовируса птиц в популяциях водных и околоводных птиц исследованной территории.

Впервые выделены редкие субтипы вируса гриппа птиц. Описаны филогенетические паттерны вируса гриппа птиц редких субтипов H7N3, H10N5, H12N5 и

обнаружены реассортантные штаммы у диких птиц, содержащие сегменты европейских и среднеазиатских вариантов, а также сегменты высокопатогенных вирусов гриппа.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследований представляют теоретическую и практическую ценность, так как дают возможность проведения более подробных фундаментальных исследований генетического разнообразия вируса гриппа на территории Евразии с учетом впервые обнаруженных уникальных вариантов вируса в ключевых для экологии его хозяев точек Каспийского региона. Выявленные экологические аспекты циркуляции вируса гриппа и оптимизация его мониторинга позволят улучшить меры по раннему обнаружению и контролю высокопатогенного гриппа среди животных в регионе.

Создана и принята на патентное депонирование в Государственную коллекцию вирусов гриппа и ОРЗ (Лаборатория эволюционной изменчивости вирусов гриппа отдела этиологии и эпидемиологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России) коллекция штаммов вируса гриппа H3N8, H1N1, H7N3, H10N5, H12N5, H8N4, H4N6-субтипов. Выделенные штаммы могут быть использованы в диагностических целях, в частности, при разработке тест-систем в качестве контрольных образцов, а также в качестве штаммов-продуцентов для создания вакцин для сельскохозяйственных птиц. Полученные нуклеотидные последовательности опубликованы в Базе данных GISAID и могут быть использованы при дизайне праймеров и создании контрольных препаратов, содержащих генетический материал вируса. Данные о видах-хозяевах вируса, полученные в результате мониторинга позволяют предполагать более вероятные пути распространения вируса гриппа. Разработанную карту-схему ключевых точек исследования вируса гриппа у диких птиц предлагается применять в качестве составной части методических рекомендаций для мониторинга высокопатогенного гриппа птиц в Каспийском регионе.

Методология и методы исследования.

В работе были использованы вирусологические, серологические, молекулярно-генетические, статистические методы исследования. Методология диссертационной работы спланирована в соответствии с ее структурой и задачами исследования. Объектами научного исследования являлись изоляты и штаммы вируса гриппа А. Научная литература, касающаяся тематики исследования, была проанализирована формально-логическими методами.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Оптимизированный протокол мониторинга вируса гриппа у диких птиц западного побережья Среднего Каспия, основанный на выборе и обосновании ключевых точек и его результаты за период 2017-2020 гг.

2. Основные молекулярно-биологические свойства, а также результаты филогенетического анализа сегментов генома выделенных штаммов вируса

3. Характеристика редких субтипов вируса, выделенных в Каспийском регионе (H7N3, H10N5, H12N5) от диких водоплавающих птиц, их биологические свойства и генетические особенности

4. Филогенетические паттерны сегментов генома NP и MP выделенных штаммов и их принадлежность к евроазиатским филогенетическим кладам

5. Характеристика консервативного сегмента неструктурного белка NS у выделенных штаммов и доказательства его принадлежности к ранее описанным аллелям A и B.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, подтверждена статистической обработкой данных, актами комиссионных испытаний, утвержденных в установленном порядке. Основные результаты исследований были доложены на: 56-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2018: (Новосибирск, 2018), XX Юбилейной Международной научной конференции «Биологическое разнообразие Кавказа и юга России», посвященной памяти выдающегося ученого, доктора биологических наук, Заслуженного деятеля науки РД и РФ, академика Российской экологической академии, профессора Гайирбега Магомедовича Абдурахманова (Махачкала, 2018), X-ой Международной конференции «Морские млекопитающие Голарктики», посвященной памяти А.В. Яблокова (Архангельск, 2018), 57-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2019: Биология (Новосибирск, 2019), XXV Международной научной конференции с элементами школы для молодых ученых «Влияние изменения климата на биологического разнообразие и распространение инфекций в Черноморско-Каспийском регионе» (Махачкала, 2023)**,** V International scientific conference (Novosibirsk, 2023).

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликованы 10 научных работы, в том числе 2 статьи в рецензируемом научном журнале, рекомендованном ВАК Минобразования и науки РФ («Юг России: экология, развитие»); 2 статьи – в базах, индексируемых Scopus (Viruses, Microorganisms).

Объем и структура работы. Работа изложена на 192 страницах компьютерного текста и состоит из обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, списка литературы, который включает в себя 234 источника, в том числе 205 работ зарубежных авторов и 9 интернет-источников и приложения. Диссертационная работа содержит 11 таблиц, 46 рисунков, 2 приложения.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Сбор материала осуществляли на территории водно-болотных угодий озера Аджи (Папас), озера Южный Аграхан, Аграханского залива и дельты реки Терек, Ачикольской системы озер районов Республики Дагестан, в местах наибольшей плотности популяций птиц.

Клоакальные мазки отбирали стерильными ватными тампонами и помещали в пробирки с транспортной средой. Хранение проб до проведения анализа осуществлялось в жидком азоте или в низкотемпературной морозильной камере при температуре не выше -70°C. Выделение изолятов вируса гриппа А осуществляли при помощи развивающихся 10-дневных куриных эмбрионов (РКЭ) по рекомендованной методике (WHO, 2011), путём инъекции суспензии первичного биологического материала в аллантоисную полость.

Образцы аллантоисной жидкости далее проверяли на гемагглютинирующую активность с помощью реакции гемагглютинации (РГА). По результатам РГА положительные образцы направляли на тестирование наличия вируса гриппа А серологическими и молекулярно-биологическими методами.

Выделение вируса гриппа А из клинических образцов производили в культуре клеток MDCK. Для определения патогенности штаммов вируса гриппа А проводили расчет IVPI-индекс, как описано в Руководстве Всемирной организации здоровья животных (WOAH, 2018).

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Результаты мониторинга вируса гриппа А у диких птиц западного побережья Среднего Каспия

На протяжении 2017-2020 гг. на территории западного побережья Среднего Каспия был собран и исследован биологический материал от 1438 особей диких птиц. Сбор был разделен на три сезона. Первый включал в себя сентябрь 2017 года - март 2018 года. Второй сезон включал сентябрь 2018 года - март 2019 года. Третий сезон включал сентябрь 2019 - март 2020 года. Выбор данных сезонов (месяцев) был обусловлен также одним из основных критериев фаунистического разнообразия прибрежных местообитаний водоплавающих птиц, а именно тем, что в этот период здесь встречаются значительные скопления зимующих птиц (Е. В. Вилков, 2003).

Собранные образцы принадлежали птицам следующих отрядов: гусеобразные, ржанкообразные, курообразные, аистообразные, журавлеобразные, поганкообразные, пеликанообразные Основное количество особей составили птицы двух отрядов – Гусеобразные (*Anseriformes*) и Журавлеобразные (*Gruiformes*). Процентное соотношение количества особей птиц данных отрядов составило от общего числа 55,42% и 40,89% соответственно. На долю остальных 5-ти отрядов птиц пришлось 3,55%. Из исследованных 797 особей отряда Гусеобразные основная доля приходилась на четыре вида: кряква обыкновенная (*Anas platyrhynchos* n=196), чирок-свистунок (*Anas crecca* n=158), чирок-трескунок (*Anas querquedula* n=102), красноголовый нырок (*Aythya ferina* n=138). Отряд Журавлеобразные (*Gruiformes*) был представлен двумя видами: лысуха (*Fulica atra*) и камышница (*Gallinula chloropus*), где лысуха занимает основную часть (n=586).

Все представленные виды имеют широкую географическую распространенность на территории западного побережья Среднего Каспия и совершают миграции в регион с целью гнездования, а также, по данным литературы, могут являться носителями вируса гриппа А.

Кроме вышеуказанных основных видов диких водоплавающих птиц, наиболее представленных в выборке, в ходе работы было обследовано незначительное количество образцов от птиц менее представленных видов, таких как широконоска (*A. clypeata*), шилохвость (*A. acuta*), свиязь (*A. penelope*), серый гусь (*A. anser*), пеганка (*Tad. tadorna*). Указанные виды птиц также относятся к отряду гусеобразные и, по данным литературы, могут являться потенциальным резервуаром вирусов

гриппа А. Исследование данных видов птиц и обнаружение у них вируса гриппа А является важным аспектом в изучении природного резервуара патогена.

Все видовое разнообразие диких птиц, от которых был собран и исследован биологический материал за 2017-2020 гг. на территории западного побережья Среднего Каспия, представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Таксономическая принадлежность птиц и количество собранных от них образцов

Отряд	**Количество видов**	**Количество особей**
Гусеобразные (Anseriformes)	14	**797**
Журавлеобразные (Gruiformes)	2	**588**
Поганкообразные (Podicipediformes)	2	**2**
Курообразные (Galliformes)	1	**1**
Пеликанообразные (Pelecaniformes)	6	**6**
Ржанкообразные (Charadriiformes)	4	**38**
Аистообразнве (Ciconiiformes)	2	**6**
7 отрядов	**26 видов**	**1438**

В ходе вирусологического мониторинга 2017-2020 гг. на территории западного побережья Среднего Прикаспия отобранный биологический материал от 1438 особей диких птиц был исследован с использованием стандартной методики WOAH на наличие в нем вируса гриппа А.

Таким образом, по результатам вирусологических исследований из 1438 образцов было получено 43 изолята гемагглютинирующих агентов. Большинство изолятов (n=36) было выделено от особей отряда Гусеобразные (*Anseriformes*) семейства Утиные (*Anatidae*). При этом основное количество изолятов было выделено от кряквы обыкновенной, чирка-трескунка и чирка-свистунка.

По результатам субтипирования был выделен 21 штамм вируса гриппа А с нижеследующей представленностью субтипов: HxNy (3), H1N1 (2), H3N8 (9), H4N6 (2), H7N3 (2), H8N4 (1), H10N5(1), H12N5 (1). Из всех выделенных штаммов 43% пришлось на H3N8. Все выделенные изоляты вируса гриппа птиц являются низкопатогенными для домашней птицы по результатам теста IVPI (табл. 2).

В результате культивирования было показано, что большая часть штаммов вируса гриппа А культивировалась в присутствии трипсина в культурах клеток. Эффективнее штаммы культивировались в системе развивающихся куриных эмбрионов, достигая максимальных титров 8.3 $\log10EID_{50/mL}$ (табл. 2). Патогенность для кур на модели IVPI оказалось низкой согласно критериям (WOAH, 2018).

Таким образом, в результате экспериментов можно сделать заключение, что все анализируемые штаммы обладают вирусологическими характеристиками, характерными для низкопатогенных вирусов гриппа птиц (LPAI).

2.2.2 Молекулярно-биологический и филогенетический анализ сегментов внутренних белков

В результате работы были определены последовательности полных геномов штаммов вируса гриппа птиц и депонировали их в международную базу данных GISAID. Из всех выделенных вирусов гриппа, для 14 штаммов получены нуклеотидные последовательности хорошего качества, с высокой степенью покрытия, что позволило использовать их в анализе. Ввиду сегментированности генома основного вируса-объекта исследования, филогенетические паттерны проанализированы посегментно. Наиболее актуальными для такого анализа являются сегменты внутренних белков, которые не играют роли в качестве поверхностных антигенов и являются более консервативными по сравнению с сегментами HA и NA. Во время подготовки базы для выравниваний был проведен BLAST-анализ исследованных нами штаммов.

Таблица 2 – Вирусологические характеристики коллекции штаммов

Наименование штамма	**Субтип**	**MDCK log10TCID50/mL**	**РКЭ log10EID50/mL**	**IVPI**
A/mallard/Dagestan/1050/2018	H7N3	5.4 ± 0.3	8.3 ± 0.3	**0**
A/mallard/Dagestan/1051/2018	H7N3	5.6 ± 0.3	8.3 ± 0.2	**0**
A/mallard/Dagestan/1092/2018	H1N1	5.0 ± 0.2	7.9 ± 0.4	**0**
A/mallard/Dagestan/1093/2018	H1N1	5.4 ± 0.2	8.0 ± 0.2	**0**
A/teal/Dagestan/1017/2018	H12N5	5.0 ± 0.2	7.9 ± 0.4	**0**
A/gadwall/Dagestan/156/2017	H4N6	5.1 ± 0.2	7.9 ± 0.4	**0**
A/teal/Dagestan/44/2018	H3N8	5.5 ± 0.2	7.9 ± 0.4	**0**
A/teal/Dagestan/114/2017	H3N8	5.3 ± 0.2	7.9 ± 0.4	**0**
A/teal/Dagestan/59/2017	H3N8	6.8 ± 0.2	8 ± 0.4	**0**
A/pochard/Dagestan/92/2017	H3N8	6.0 ± 0.3	7.9 ± 0.2	**0**
A/teal/Dagestan/670/2017	H3N8	5.2 ± 0.2	7.9 ± 0.4	**0**
A/teal/Dagestan/141/2017	H3N8	5.0 ± 0.2	7.7 ± 0.3	**0**
A/teal/Dagestan/82/2017	H3N8	7.4 ± 0.2	8.2 ± 0.4	**0**
A/mallard/Dagestan/004/2018	H10N5	5.0 ± 0.2	7.9 ± 0.4	**0**
A/teal/Dagestan/120/2017	H3N8	5.6 ± 0.2	7.7 ± 0.4	**0**
A/teal/Dagestan/23/2018	H3N8	5.0 ± 0.2	8.1 ± 0.4	**0**
A/teal/Dagestan/57/2018	H8N4	5.0 ± 0.2	7.6 ± 0.4	**0**
A/teal/Dagestan/34/2017	H4N6	5.0 ± 0.2	7.9 ± 0.4	**0**

В целом, в результате этого этапа работы были обнаружены различные филогенетические паттерны, однако для всех вирусов показана принадлежность сегментов к классическим евразийским вариантам сегментов вирусов диких птиц (Eurasian Avian-like). Следующим этапом явилось детальное молекулярно-биологическое и филогенетическое исследование штаммов редких субтипов, к которым мы отнесли штаммы H7N3, H10N5 И H12N5. Выбор обусловлен критерием новизны, так как по данным литературы и международных баз данных они являются менее изученными и могут представлять вирусы из альтернативных резервуаров (птиц различных экологических и таксономических групп). Для них проведен дополнительный филогенетический анализ сегментов поверхностных гликопроте-

инов и молекулярно-биологических маркеров. Штаммы наиболее распространенных в популяциях диких птиц H1N1, H3N8, H4N6 были исключены из этой задачи. Для таких штаммов есть более обширная доступная информация в литературе и международных базах данных. Исследование филогенетических характеристик и потенциальных молекулярных маркеров биологических свойств является предметом будущих исследований.

2.2.3 Биологические свойства и генетическая характеристика вирусов гриппа А субтип H7N3

Внутривенный тест на индекс патогенности для штаммов A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3) оказался равен нулю. Кроме того, данные штаммы апатогенны для мышей и не реплицируются эффективно в их легких. В то же время оба штамма проявляют антигенные свойства на моделях мышей.

Филогенетический анализ показал, что сегменты H7N3 географически сгруппированы с азиатскими (HA, PB1, PA, NS), африканскими (MP, NA, NP) и европейскими (PB2) линиями AIV. Внутренние сегменты генов вируса H7N3 AIV также кластеризовались с циркулирующими LPAI по всей Евразии, включая, например, Индийский субконтинент, о чем свидетельствуют тесные филогенетические взаимосвязи генов полимеразы (PB2, PB1 и PA) и NS, MP и NP с LPAI, выделенными дикими и домашними утками в Бангладеш. Интересно, что внутренние гены PB2, PB1, PA и NP вирусов H7N3 также показали тесную взаимосвязь с генами высокопатогенных AIV (HPAIV) H5N8, H5N6 и H5N5 из евразийских линий (клада H5 2.3.4.4b). Это указывает на то, что вирусы H7N3 в этом исследовании имели общий внутренний генофонд вирусных сегментов, обнаруженных как в LPAI, так и в HPAI в Евразии, что указывает на склонность к разнообразной реассортации в резервуарах-хозяевах.

Примечательно, что за исключением штаммов A/teal/Egypt/MB-D-487OP/2016 (H7N3) и A/Spot-billed duck/South Korea/WKU2019-1/2019, все остальные штаммы не имеют достоверной кластеризации с изучаемыми штаммами. Включая зоонозный вариант вируса H7N9-субтипа от человека (T. Tanikawa et al., 2019), они достоверно принадлежат к различным кладам, которые являются специфичными по географическим территориям и фенотипу вируса. Обособлена американская клада, включающая все американские референс-штаммы.

Хронология выделения всех взятых в анализ последовательностей, указывает на то, что изучаемые штаммы H7N3 могли циркулировать более двух десятилетий в птичьих резервуарах Евразии, что подчеркивает сохранение этого подтипа в популяциях диких птиц (рисунок 1).

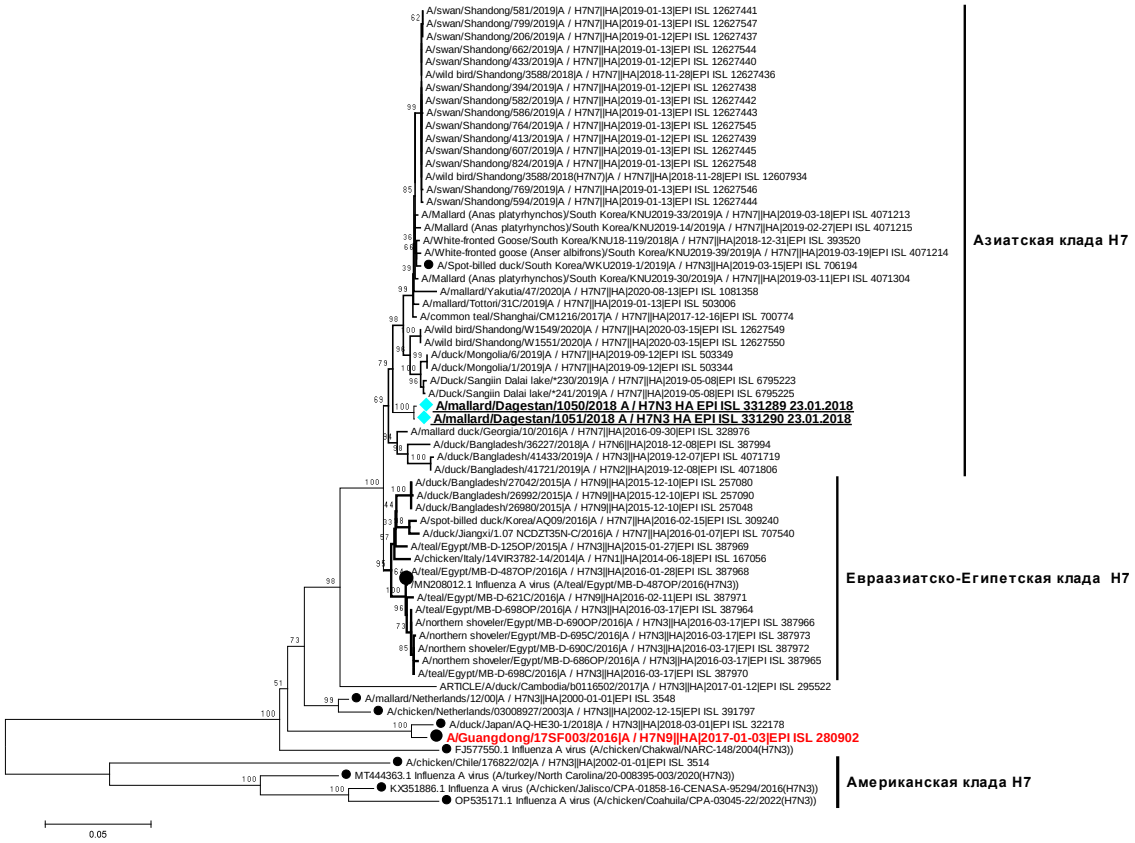


Рисунок 1 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома НА вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечены штаммы A/mallard/Dagestan/1050/2018 (H7N3) и A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H7N3). Референс-штаммы отмечены черным кругом, зоонозный штамм выделен красным. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

2.2.4 Биологические свойства и генетическая характеристика вируса гриппа А субтип H10N5

Поскольку ранее было известно, что субтип H10 вируса гриппа А способен заражать людей, то было важно оценить патогенность данного субтипа для млекопитающих, и, следовательно, патогенный потенциал для человека.

Молекулярная характеристика аминокислотных последовательностей была проведена для оценки наличия генетических маркеров, потенциально влияющих на биологические характеристики A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H10N5). Структура сайта расщепления НА показала отсутствие многоосновных аминокислот, что указывает на то, что эти вирусы несут маркеры низкой патогенности в аминокислотных последовательностях (PELPKGR/GLF). В нашем исследовании мы не обнаружили сегментов штамма H10N5, которые бы относились к зоонозным вариантам. Филогенетический анализ последовательностей НА субтипа H10, доступных в базе данных, показал, что вирусы гриппа А субтип H10 можно разделить на североамериканскую и евразийскую линии (S. Liu et al., 2009). Все сегменты генома

нашего штамма A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H10N5) оказались евразийской линии.

Таким образом, исследованный штамм A/mallard/Dagestan/1051/2018 (H10N5) является классическим низкопатогенным вирусом диких уток и не обладает патогенным потенциалом для человека согласно изученным маркерам. Однако в будущем не исключена передача сегментов от других зоонозных вариантов. Низкая патогенность вирусов гриппа А субтип H10 у птиц затрудняет их обнаружение, позволяя вирусу сохраняться и распространяться; это означает, что дикие птицы и домашняя птица могут выступать в качестве крупных резервуаров вируса (рисунок 2).

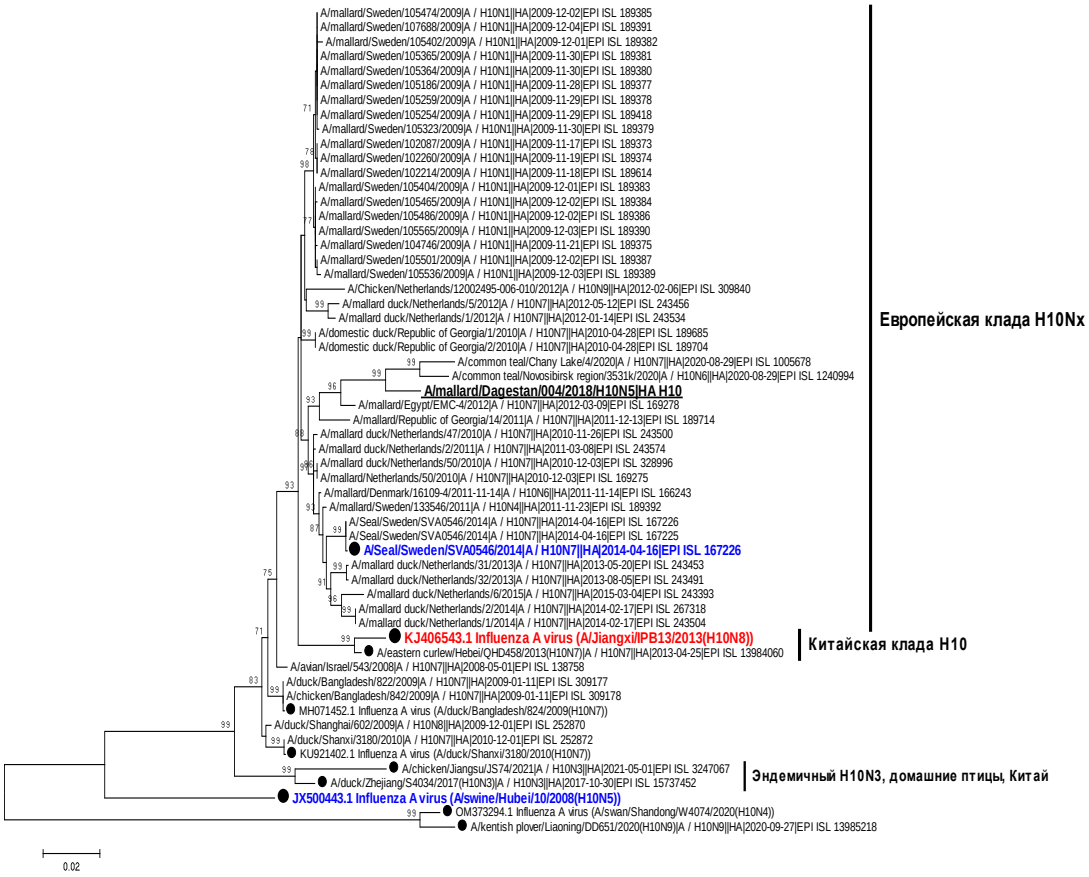


Рисунок 2 – Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей сегмента генома НА (H10) вируса гриппа, построенное методом максимального правдоподобия, основанного на модели Тамуры-Неи в программе MEGA5. Достоверность топологии ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (500 шагов репликации), значения бутстреп-статистики указаны слева от ветвей. Подчеркиванием отмечен штамм A/mallard/Dagestan/004/2018 (H10N5). Референс-штаммы отмечены черным кругом; зоонозный штамм выделен красным; штаммы, выделенные от млекопитающих выделены синим. Шкала длины ветвей указывает количество нуклеотидных замен на сайт

2.2.5 Биологические свойства и генетическая характеристика вируса гриппа А субтип H12N5

В нашем исследовании мы впервые обнаружили вирус гриппа А редкого субтипа H12N5 на территории западного побережья Среднего Каспия и поставили задачу оценить патогенный потенциал для животных и человека.

Антигенные различия между вирусами A/H12 были выявлены в реакции торможения гемагглютинации с использованием поликлональной куриной антисыворотки, полученной против вируса A/teal/Dagestan/1017/2018 и других референс-вирусов H12-субтипа. Все изоляты продемонстрировали перекрестную реактивность со всеми куриными постинфекционными антисыворотками (табл. 3). Только один изолят A/1377, который принадлежал к американской линии, показал четырехкратное снижение титров HA для антисыворотки, полученной против A/962 и A/999, по сравнению с гомологичными вирусами, что указывает на антигенное разнообразие между этими вирусами.

Таблица 3 – Результаты изучения антигенных свойств штамма A/teal/Dagestan/1017/2018 в реакции торможения гемагглютинации

Сыворотки кур	**Антиген**					
	A/43	**A/324**	**A/1017**	**A/962**	**A/999**	**A/1377**
A/1377	80	80	80	80	160	160
A/999	80	80	80	80	160	40
A/962	80	80	80	160	160	40
A/1017	160	160	160	320	640	160
A/324	160	160	80	160	640	160
A/43	160	160	80	160	320	80

Молекулярно-биологический анализ штамма A/teal/Dagestan/1017/2018 выявил замены, отвечающие за ограниченную вирулентность у мышей и хорьков в сегментах PA (P149S) и PB2(Q391E), соответственно. С другой стороны, имелись замены в сегменте PB2 (L89V, G309D, T339K, R477G, I495V, K627E, A676T), которые потенциально могут повысить активность полимеразы в клетках мыши. Кроме того, наряду с заменой в PB2 (K627E), снижающей скорость репликации в клетках млекопитающих, там же имелась замена N701D, которая может приводить к увеличению летальности у мышей. Однако, в нашем эксперименте мы не обнаружили летальности у мышей. Штамм обладал высокой репликативной активностью на культурах клеток MDCK, Vero и A549 (5.0 -5.4 ± 0. 2 log10TCID50/mL), а также в системе развивающихся куриных эмбрионов (7.9 ± 0.4 log10 EID50/mL).

Филогенетический анализ выявил, что исследуемый штамм A/teal/Dagestan/1017/2018 (H12N5) принадлежит к евразийской генетической линии, в том числе по сегменту белка HA, который является основным антигеном вируса гриппа А. Достоверно известно, что существует отдельная североамериканская и южноамериканская линии.

Азиатские варианты H12 по результатам нашего исследования и данным литературы имеют специфические клады, циркулирующие в Юго-Восточной Азии, с проникновением на северные территории гнездования. Подводя итог, это исследование предполагает, что появление генетически разнообразных вирусов H12 свя-

зано с миграцией диких птиц. Мы предполагаем, что продолжение эпиднадзора за разнообразием H12 у диких птиц необходимо для улучшения нашего понимания естественной истории редких субтипов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимость мероприятия по мониторингу вируса гриппа А территориях западного побережья на обусловлена климатогеографическими и экологическими особенностям. Республика Дагестан является одним из регионов, который расположен на путях миграций птиц между странами средиземноморского бассейна, Африки и России. Обширные системы рек и озер на данных территориях являются гнездовыми ареалами птиц водных экологических комплексов, местами их остановок и зимовки. Пересечения миграционных путей повышают вероятность участия диких птиц в циркуляции вирусов гриппа на обширных территориях.

В данной работе были проведены масштабные исследования экологических особенностей и генетического разнообразия вируса гриппа А, циркулирующего у диких птиц на территории западного побережья Среднего Каспия.

По результатам исследований сделаны следующие ***выводы:***

1. Оптимизированный за счет выбора и обоснования ключевых точек мониторинг вируса гриппа А, проведенный в 2017-2020 гг. на территории западного побережья Среднего Каспия, включал отбор и анализ проб биоматериала от 1438 особей 26 видов птиц 7 отрядов. В результате был выделен и охарактеризован 21 штамм вируса гриппа птиц, что составило 1,46% от общего количества исследованных образов. Дополнительно было выделено 23 гемагглютинирующих агента, не относящихся к вирусу гриппа А, из которых 15 принадлежали авулавирусу птиц (APMV).

2. Вирус гриппа А был выделен от мигрирующих птиц следующих видов: чирок-свистунок (*Anas crecca* n=8), кряква обыкновенная (*Anas platyrhynchos* n=6), чирок-трескунок (*Anas querquedula* n=3), лысуха *(Fulica atra* n=2), красноголовый нырок (*Aythya ferina* n=1), утка серая (*Anas strepera* n=1). Все выделенные штаммы были получены от птиц отряда гусеобразные (*Anseriformes*) семейства Утиные (*Anatidae*), которые относятся к водно-болотной экологической группе, что подтверждает их значительную роль в циркуляции вируса гриппа А.

3. Для выделенных штаммов вируса гриппа были определены субтипы и получены нуклеотидные последовательности: H1N1 (n=2), H3N8 (n=9), H4N6 (n=2), H7N3 (n=2), H8N4 (n=1), H10N5(n=1), H12N5 (n=1). Из всех выявленных штаммов 43% принадлежали к субтипу H3N8. Не было выявлено высокопатогенного вируса гриппа H5 – субтипа. Для трех изолятов с помощью использованных методов субтип подтвердить не удалось (HxNy (n=3)).

4. В рамках филогенетических подгрупп была показана консервативность сегментов генома NP и MP. Филогенетический анализ MP сегмента выявил принадлежность к 2 евроазиатским кладам вируса гриппа А. По сегменту NP штаммы A/teal/Dagestan/120/2017 и A/teal/Dagestan/57d/2018, а также A/gadwall/Dagestan/156/2017 и A/teal/Dagestan/1017/2018 имели наибольшую иден-

тичность между собой достигающую 99,5%, несмотря на то, что были изолированы в разные сезоны сбора образцов.

5. Показана консервативность сегмента неструктурного белка, который для исследованных штаммов относился к двум аллелям A и B. Нуклеотидные последовательности генетической подгруппы 2.2 аллеля A для сегмента NS оказались характерны для штаммов, циркулирующих в Восточно-Азиатском регионе, в то время как последовательности NS подгруппы 2.1 того же аллеля A характерны не только для азиатских вариантов вируса, но и для европейских.

6. Впервые для Каспийского региона выявлен вирус гриппа редкого H12N5-субтипа в популяциях двух территориальных группировок птиц: западносибирской - казахстанско-каспийской и центральноевропейской – южноевропейской. Филогенетический анализ подтвердил принадлежность к евроазиатским кладам сегментов внутренних белков вируса и указывает на высокую вероятность обмена сегментами с западносибирскими вирусами гриппа A. Штамм обладал высокой репликативной активностью в культурах клеток MDCK, Vero и A549 (5.0 -5.4 ± 0. 2 log10$TCID_{50/mL}$), а также в системе развивающихся куриных эмбрионов (7.9 ± 0.4 log10 $EID_{50/mL}$). При этом штамм не проявлял вирулентных свойств в экспериментальной модели кур и мышей.

7. Выявлены два штамма вируса H7N3 (LPAIV), у которых сегмент гемагглютинина H7 (HA) был филогенетически связан с современными штаммами из Монголии и стран Средней Азии и предшествовал распространению этой сублинии H7 в Восточной Азии в 2019 году. Сегмент нейраминидазы N3 и внутренние гены были филогенетически связаны с таковыми, выделенными ранее в Каспийском регионе. Сегменты полимеразы и нуклеопротеина сгруппированы с вирусами H5 HPAI (клада 2.3.4.4b), что указывает на широкое распространение H7 LPAIV и потенциал этого подтипа для реассортации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Уникальные биологические свойства некоторых штаммов, переданных на патентное депонирование в государственные коллекции необходимо использовать для изучения биологии вируса гриппа различных субтипов, лечебной и профилактической эффективности противовирусных препаратов, для создания антиген содержащих диагностических препаратов, вакцин и в качестве контрольной референс-панели для ПРЦ.

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

Разработанную карту-схему ключевых точек исследования вируса гриппа у диких птиц предлагается использовать в качестве составной части методических рекомендаций для мониторинга высокопатогенного гриппа птиц в Каспийском регионе.

Полученные результаты целесообразно использовать в учебном процессе в специализированных ВУЗах, а также в дальнейших научных исследованиях и в практической противоэпизоотической работе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобразования и науки РФ

1. Дерко, А.А. Парамиксовирус птиц APMV-4, выделенный от кряквы обыкновенной (Anas platyrhynchos, Linnaeus, 1758): первый случай обнаружения в Западном Прикаспии / А.А. Дерко, Н.А. Дубовицкий, **Т.А. Мурашкина** // Юг России: экология, развитие. – 2021. – Т. 10. – № 3. – С. 81-87.

2. Алексеев, А.Ю. Анализ миграций птиц водного и околоводного комплекса на территории республики Дагестан и обоснование выбора ключевых точек мониторинга гриппа типа А / А.Ю. Алексеев, **Т.А. Мурашкина,** Д.М. Джамалутдинов // Юг России: экология, развитие. – 2019. – № 1. – С. 137-149.

Публикации в изданиях, входящих в базу цитирования Scopus

3. **Murashkina, T**. Avian Influenza Virus and Avian Paramyxoviruses in Wild Waterfowl of the Western Coast of the Caspian Sea (2017–2020) / T. Murashkina, K. Sharshov, A. Gadzhiev // Viruses. – 2024. – Vol. 16. – № 4 – P. 598.

4. Gulyaeva, M. Biological properties and genetic characterization of novel low pathogenic h7n3 avian influenza viruses isolated from mallard ducks in the caspian region, dagestan, russia / M. Gulyaeva, M. A. De Marco, **T. Murashkina /** Microorganisms. – 2021. – Vol. 9. – № 4. – С. 864.

Публикации в других изданиях

5. **Мурашкина, Т.А.** Циркуляция вирусов гриппа у диких птиц северо-западного Прикаспия / Т.А. Мурашкина // МНСК-2018: Биология. – 2018. – С. 169

6. Шаршов, К.А. Результаты мониторинга вируса гриппа у диких птиц на территории республики Дагестан (осень 2017- весна 2018 гг.) / К.А. Шаршов, А.Ю. Алексеев, **Т.А. Мурашкина** // Биологическое разнообразие Кавказа и юга России: материалы XX Юбилейной Международной науч. конф., посвящ. памяти выдающегося ученого, д-ра биол. наук, Заслуженного деятеля науки РД и РФ, акад. Российской экологической академии, проф. Гайирбега Магомедовича Абдурахманова. – Махачкала, 2018. – С. 531.

7. Алексеев, А.Ю. Мониторинг РНК-содержащих орто- и пара-миксовирусов у водных млекопитающих и птиц Республики Дагестан / А.Ю. Алексеев, К.А. Шаршов, А.А. Гаджиев, И.А. Соболев, А.А. Дерко, **Т.А. Мурашкина,** М.З. Магомедова, М.К. Ибрагимов, Д.М. Джамалутдинов, А.М. Шестопалов // Морские млекопитающие Голарктики: сб. тезисов X-ой Междунар. конф., посвящ. памяти А.В. Яблокова. – Архангельск, 2018. – С. 13-14.

8. **Мурашкина, Т.А.** РНК-вирусы водоплавающих и околоводных птиц Северо-Западного Прикаспия / Т.А. Мурашкина // Материалы 57-й Междунар. науч. студенческой конф. МНСК-2019: Биология / Новосибирский гос. ун-т. – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2019. – С. 24-24.

9. **Мурашкина, Т.А.** Итоги мониторинга вируса гриппа у диких птиц западного побережья Среднего Каспия за 2017-2020 гг. / **Т.А. Мурашкина,**

А.А. Дерко, Н.А. Дубовицкий, Н.С. Касьянов // Влияние изменения климата на биологическое разнообразие и распространение инфекций в Черноморско-Каспийском регионе: материалы XXV Междунар. науч. конф. с элементами школы для молодых ученых. – Махачкала, 2023. – С. 349.

10. **Murashkina, T.A.** Monitoring of Avian influenza virus in wild birds at the west coast of the Middle Caspian Sea, 2017-2020 / T.A. Murashkina // V International scientific conference. – Novosibirsk, 2023. – С. 21-22.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность всем сотрудникам лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоразнообразия вирусов и других подразделений НИИ вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»; сотрудникам Института Экологии и устойчивого развития Дагестанского государственного университета за помощь в выполнении настоящей работы.