

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТА ВИРУСА ГРИППА А/CHICKEN/CHELYABINSK/30/2019 H9N2, ВЫДЕЛЕННОГО НА ТЕРРИТОРИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Н. Г. Зиняков¹, О. С. Осипова², П. Б. Акшалова³, В. Ю. Сосипаторова⁴, А. В. Андриясов⁵, Д. Б. Андрейчук⁶, И. А. Чвала⁷

¹ Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: zinyakov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3015-5594

² Ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: osipova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3176-157x

³ Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: akshalova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-1520-1887

⁴ Младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: sosipatorova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-9376-4728

⁵ Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: andriyasov_av@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-6314-2119

⁶ Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: andreychuk@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1681-5795

⁷ Заместитель директора по НИР и мониторингу, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: chvala@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1659-3256

РЕЗЮМЕ

В работе представлены данные по изучению генетических свойств изолята вируса гриппа A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2, выделенного в феврале 2019 г. из патологического материала (внутренних органов кур), поступившего из птицеводства Челябинской области. В результате вирусологических исследований определили подтип выделенного вируса – H9N2. При секвенировании участка гена гемагглютинаина установлена аминокислотная последовательность сайта нарезания R527/G, характерная для низковирулентного вируса гриппа птиц. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена гемагглютинаина (1–1539 п. н. открытой рамки считывания) показал принадлежность изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 к генетической группе G1 низковирулентного вируса гриппа A/H9, представители которой широко распространены в странах Ближнего Востока и Средней Азии. Определена полная нуклеотидная последовательность генома исследуемого патогена. В результате сравнительного анализа всех геномных сегментов с использованием базы данных

GenBank установлено высокое родство (более 99%) вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 с изолятами вируса гриппа A/H9, циркулировавшими на территории Израиля в 2006–2012 гг. Согласно анализу предсказанной аминокислотной последовательности изучаемого изолята выявлены позиции некоторых молекулярных маркеров, определяющие биологические свойства вируса. Большинство аминокислотных позиций гемагглютинаина (по нумерации последовательности подтипа H3) предполагают сходство к ACA2-3Gal-рецепторам эпителиальных клеток птиц. Выявлены аминокислотные замены на участке рецептор-связывающего домена в сравнении с изолятами вируса гриппа A/H9N2, выделенными на территории России в 2018 г. Первичная структура генома изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 имеет очень высокий уровень генетического сходства по всем генам с изолятом вируса гриппа A/chicken/Israel/215/2007 H9N2, использовавшимся в качестве вакцинного штамма.

Ключевые слова: грипп птиц, H9N2, генетический анализ, аминокислотные замены.

UDC 619:578.832.1:636.52/58:578.5

ANALYSIS OF GENETIC CHARACTERISTICS OF INFLUENZA VIRUS A/CHICKEN/CHELYABINSK/30/2019 H9N2 ISOLATED IN CHELYABINSK OBLAST

N. G. Zinyakov¹, O. S. Osipova², P. B. Akshalova³, V. Yu. Sosipatorova⁴, A. V. Andriyasov⁵, D. B. Andreychuk⁶, I. A. Chvala⁷

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: zinyakov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3015-5594

² Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: osipova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3176-157x

³ Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: akshalova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-1520-1887

⁴ Junior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: sosipatorova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-9376-4728

⁵ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: andriyasov_av@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-6314-2119

⁶ Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: andreychuk@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1681-5795

⁷ Deputy Director for Research and Monitoring, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: chvala@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1659-3256

SUMMARY

The paper presents data on the study of genetic characteristics of the influenza virus A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 isolated from pathological material (chicken internal organs) in February 2019 and received from the poultry farm in the Chelyabinsk Oblast. The H9N2 subtype of the isolated virus was identified based on virological analysis. Sequencing of the hemagglutinin gene segment revealed that the amino acid sequence at the cleavage site was R527/G, which is characteristic of a low virulent avian influenza virus. Phylogenetic analysis of the obtained nucleotide sequences of the hemagglutinin gene fragment (1–1539 bp open reading frame) showed that the A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 isolate belongs to the G1 genetic group of the low virulent influenza virus A/H9, the representatives of which are widely spread in the Middle Eastern and Central Asian countries. The complete nucleotide genome sequence of the studied pathogen was determined. The comparative analysis of all genomic segments using the GenBank

database revealed a close relationship (over 99%) between the A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 virus and the A/H9 influenza virus isolates circulating in Israel in 2006–2012. According to the analysis of the predicted amino acid sequence of the studied isolate, the positions of some molecular markers that determine the biological properties of the virus have been identified. Most amino acid positions of hemagglutinin (according to H3 subtype sequence numbering) suggest affinity for the ACA2-3Gal-receptors of avian epithelial cells. Amino acid substitutions were detected at the site within the receptor-binding domain as compared to the A/H9N2 influenza virus isolates obtained in Russia in 2018. The primary structure of the A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 isolate demonstrates a very high level of genetic similarity to the influenza virus isolate A/chicken/Israel/215/2007 H9N2 used as a vaccine strain.

Key words: avian influenza, H9N2, genetic analysis, amino acid substitutions.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа птиц (ВГП) относится к семейству *Orthomyxoviridae*, включающему согласно международной классификации International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) релиз Master Species List 2018b. v2 семь родов: *Alphainfluenzavirus* (A), *Betainfluenzavirus* (B), *Gammainfluenzavirus* (C), *Deltainfluenzavirus* (D), *Quarantavirus*, *Thogovirus*, *Isavirus*. Вирус гриппа типа А по строению поверхностных гликопротеинов классифицируют на 16 подтипов по гемагглютинину и 9 подтипов по нейраминидазе [4, 11].

Вирусы гриппа, выделенные от птиц, по признаку вирулентности можно разделить на две обширные группы. Высоковирулентные вирусы, вызывающие острую генерализованную болезнь со смертностью в стаде до 100%, относятся к подтипам H5 и H7. Вирусы остальных подтипов, как правило, вызывают легкое, преимущественно респираторное или бессимптомное заболевание и классифицируются как низковирулентные [1]. Однако при нарушении условий содержания птиц и наличии ассоциированных заболеваний возможно развитие клинически выраженной болезни, приводящей к снижению продуктивности, санитарной выбраковке больных птиц из стада, повышенному отходу молодняка.

Вирусы подтипа H9N2 широко распространены в Китае, Юго-Восточной Азии, Пакистане, Южной Корее, Иране, Израиле, Индии, Африке как у дикой, так и у домашней птицы [2, 3, 5, 7–9, 12, 14]. Согласно литературным данным, вирусы подтипа H9 образуют несколько генетических групп: G1, Y280 и Y439 [1, 8, 10, 13]. Изоляты вируса гриппа из группы G1 являются эндемичными для стран Ближнего Востока и Средней Азии [8, 12]. В Российской Федерации грипп птиц подтипа H9N2 был выявлен в Амурской области в 2012 г., на Дальнем Востоке в Приморском крае в 2018 г., на территории Челябинской области в 2019 г. В последнее время вирусы гриппа птиц подтипа H9N2 широко распространены среди домашней птицы, представляют собой реальную угрозу для мировой птицеводческой отрасли и потенциальную опасность для человека [1].

Учитывая актуальные литературные данные [1, 2, 6], значительный интерес представляет изучение генетических свойств выделенного в 2019 г. на территории Челябинской области изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2, что стало целью данного исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусовыделение. Проводили в 10-суточных свободных от патогенной микрофлоры эмбрионах кур (СПФ-КЭ). Из биологического материала готовили 10–20%-ю суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2–7,4) и вводили ее в аллантоисную полость КЭ в объеме 0,2 см³. От эмбрионов, погибших через 24 ч инкубации и более, отбирали экстраэмбриональную жидкость (ЭЭЖ) с целью проведения последующих исследований.

Выделение РНК. Выделение суммарной РНК осуществляли с помощью набора «РИБО-сорб» (кат. № K2-1-Et-100) согласно инструкции производителя.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). ОТ-ПЦР-РВ проводили в одну стадию с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, кат. № 210212) и 25 мМ раствора MgCl₂ (Promega, в наборе

с кат. № M8296) и систем праймеров на ген М и ген Н подтипа H9. Собирали смесь объемом 25 мкл: 9 мкл деионизированной воды, 5 мкл 5× буфера для ОТ-ПЦР, 1,25 мкл 25 мМ раствора MgCl₂, 1 мкл раствора дНТФ 10 мМ, по 1 мкл раствора прямого и обратного праймеров с концентрацией 10 пмоль/мкл, 0,75 мкл раствора флуоресцентного зонда с концентрацией 10 пмоль/мкл, 1 мкл смеси ферментов обратной транскриптазы и полимеразы, 5 мкл раствора суммарной РНК. Обратную транскрипцию проводили 30 мин при 50 °С. Собственно для амплификации применяли следующие температурно-временные параметры: 95 °С – 10 мин (активация полимеразы), далее 40 циклов, каждый из которых состоит из трех шагов: 95 °С – 10 с, 50 °С – 35 с, 72 °С – 10 с.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Классическую ОТ-ПЦР проводили в одну стадию с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, кат. № 210212) и 25 мМ раствора MgCl₂ (Promega, в наборе с кат. № M8296) и системы праймеров на ген Н подтипа H9. Собирали смесь объемом 25 мкл, содержащую 9,75 мкл деионизированной воды, 5 мкл 5× буфера для ОТ-ПЦР, 1,25 мкл 25 мМ раствора MgCl₂, 1 мкл раствора дНТФ 10 мМ, по 1 мкл раствора прямого и обратного праймеров с концентрацией 10 пмоль/мкл, 1 мкл смеси ферментов обратной транскриптазы и полимеразы, 5 мкл раствора суммарной РНК. Обратную транскрипцию проводили 30 мин при 50 °С. Собственно для амплификации применяли следующие температурно-временные параметры: 95 °С – 10 мин (активация полимеразы), далее 40 циклов, каждый из которых состоит из трех шагов: 95 °С – 50 с, 55 °С – 50 с, 72 °С – 60 с.

Идентификация выделенного вируса. Идентификацию вируса проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с референтными сыворотками против ВГП подтипов H1–H16 (IZISVe, Италия) по HA и в реакции нейраминидазной активности (РТНА) с референтными сыворотками против ВГП подтипов N1–N9 (IZISVe, Италия) по NA. Реакции проводили согласно рекомендациям МЭБ и общепринятым методикам [4, 15, 16].

Секвенирование. Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена HA осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 с использованием наборов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя. Полногеномное секвенирование осуществляли с помощью генетического анализатора MySeq (Illumina) согласно инструкции производителя. Для приготовления библиотек использовали коммерческие наборы Nextera XT, Nextera XT Index Kit (Illumina).

Нуклеотидные последовательности. В работе использованы нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов ВГП подтипа H9, опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) и на платформе EpiFlu (<https://www.gisaid.org/>).

Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit версия 7.0.5.3. Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы множественного выравнивания ClustalW. Построение филогенетического дерева осуществляли с помощью алгоритма NJ в реализации пакета MEGA версия 6.06.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В феврале 2019 г. в рамках выполнения программы государственного эпизоотологического мониторинга в референтной лаборатории вирусных болезней птиц (ФГБУ «ВНИИЗЖ») были проведены исследования 20 проб внутренних органов, полученных из птице-комплекса Челябинской области. Суспензии проб патологического материала инокулировали 10-суточным СПФ-КЭ. Гибели эмбрионов в течение 72 ч инкубации не отмечали. Гемагглютинирующая активность была обнаружена в 14 пробах ЭЭЖ, отобранных от зараженных СПФ-КЭ. Из остальных 6 проб биологического материала вирус в течение двух последовательных пассажей в СПФ-КЭ выделен не был.

Идентификация в РТГА со специфическими сыворотками Н1–Н16 и в РТНА с использованием референтных сывороток N1–N8 показала принадлежность выделенного инфекционного агента к подтипу Н9N2.

В результате постановки ОТ-ПЦР-РВ в полученных пробах был выявлен генетический материал вируса гриппа птиц типа А и идентифицирован подтип Н9. ВГП подтипов Н5, Н7 в исследованных пробах не выявлен. Согласно результатам секвенирования фрагмента гена НА была подтверждена принадлежность изолятов к подтипу Н9 (наличие сайта нарезания R55R/GLF).

Для дальнейшего изучения был выбран изолят A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 Н9N2 с наивысшей гемагглютинирующей активностью (титр в реакции гемагглютинации составил 1:256).

В результате анализа нуклеотидной последовательности гена НА выделенного вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 Н9N2 было установлено родство с группой изолятов, выявленных ранее на территории Израиля. Для филогенетического анализа был использован фрагмент нуклеотидной последовательности гена гемагглютинина (1–1539 п. н. открытой рамки считывания (ОРС)). В результате анализа было установлено, что выделенный вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 относится к генетической группе G1 (рис. 1).

Дальнейшая характеристика вируса была основана на результатах ранее выполненной работы по структурированию вирусов подтипа Н9N2, выделенных на территории Израиля [8]. Проведенный анализ показал, что вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 Н9N2 входит в обширную группу, основу которой составляют изоляты вируса Н9N2 клады IV. В данную кладу вошли вирусы, выделенные на территории Израиля, Иордании и Ливана в период с 2006 по 2012 г. [12]. Вирус A/chicken/Israel/215/2007 был взят для сравнения в качестве основного, как наиболее охарактеризованный ранее и использовавшийся в качестве вакцинного штамма [8].

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

Для сравнительного анализа были использованы доступные нуклеотидные последовательности, со-

державшие ОРС, ближайших его соседей по филогенетическому дереву, выделенных в Израиле (A/chicken/Israel/215/2007), России (A/chicken/Siberia/03/2018, A/chicken/Amur_Russia/17/2018), Египте (A/chicken/Egypt/D7099/2013), Ливане (A/quail/Lebanon/273/2010). Было установлено, что выделенный вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 имеет очень высокий уровень генетической идентичности по всем генам с изолятом A/chicken/Israel/215/2007 Н9N2 (табл.).

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

Проведенный анализ аминокислотной последовательности белка НА изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 Н9N2 показал наличие аминокислот G₂₂₅LIG₂₂₈ (по нумерации Н3-подтипа) в рецептор-связывающей части вирусного протеина (рис. 2).

Для аминокислотной композиции G₂₂₅LIG₂₂₈ предполагается сродство к рецепторам птиц АСА2-3Gal и отсутствие взаимодействия с рецепторами млекопитающих группы АСА2-6Gal [17]. Таким образом, преимущественными носителями вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 Н9N2 должны быть птицы. Однако существуют работы, показывающие, что замена Q226L

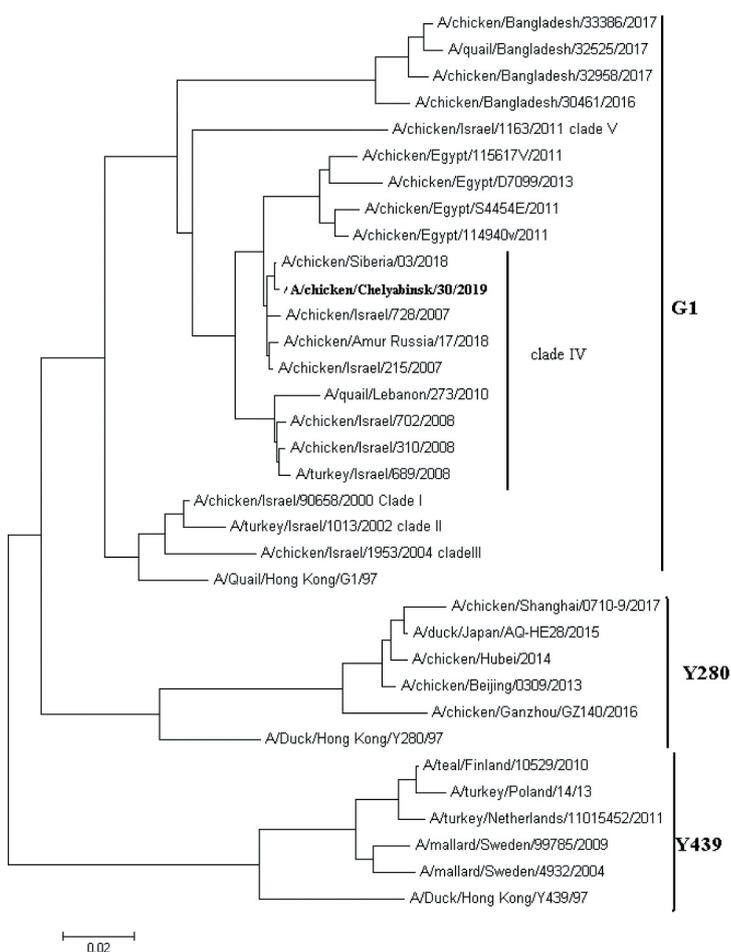


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом NJ по нуклеотидной последовательности фрагмента гена НА (1–1539 п. н. ОРС) вируса гриппа птиц подтипа Н9

Таблица 1

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

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

способствует взаимодействию вируса гриппа с рецепторами клеток дыхательных путей человека [18].

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

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

Выявленное высокое генетическое сходство вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 с ранее выявленными A/chicken/Siberia/03/2018 и A/chicken/Amur_Russia/17/2018 позволяет предположить, что занос вируса на территорию Российской Федерации произошел из небольшого географического ареала. Для сравнения можно ознакомиться с доступной информацией по изолятам вируса гриппа подтипа H9N2, выделенным на территории Народной Республики Бангладеш [7]. Согласно приведенным данным, генетическая гетерогенность среди вирусов группы G1 из Бангладеш значительно больше. Так, по гену HA различие между изолятами 2016 и 2017 гг. достигает 3%. В пользу единственного источника заноса вируса генетической группы G1 на территорию Российской Федерации также указывает географическая удаленность очагов выявления вирусов A/chicken/Siberia/03/2018 (Новосибирская область), A/chicken/Amur_Russia/17/2018 (Амурская область) и A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 (Челябинская область). К сожалению, установить источник заноса крайне затруднительно в связи с низ-

кой патогенностью вирусов подтипа H9N2 для дикой и домашней птицы, когда возможно длительное бессимптомное носительство.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 принадлежит к генетической группе G1 подтипа H9. Полногеномное секвенирование позволило установить отсутствие реассортации геномных сегментов относительно ранее выявленных на территории Российской Федерации вирусов подтипа H9N2 генетической группы G1. Установлено высокое сходство выявленного вируса с вирусом A/chicken/Israel/215/2007. Анализ молекулярных маркеров вируса свидетельствует об адаптации вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 к популяции птиц.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A global perspective on H9N2 avian influenza virus / T. P. Peacock, J. James, J. E. Sealy, M. Iqbal // Viruses. – 2019. – Vol. 11 (7):e620; DOI: 10.3390/v11070620.
2. A novel genotype H9N2 influenza virus possessing human H5N1 internal genomes has been circulating in poultry in eastern China since 1998 / P. Zhang, Y. Tang, X. Liu [et al.] // J. Virol. – 2009. – Vol. 83 (17). – P. 8428–8438; DOI: 10.1128/JVI.00659-09.
3. Alexander D. J. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002–2006 // Avian Dis. – 2007. – Vol. 51 (Suppl. 1). – P. 161–166; DOI: 10.1637/7602-041306R.1.
4. Avian influenza (infection with avian influenza viruses) // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals / OIE. – 2018. – Chap. 3.3.4. – URL: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf (дата обращения: 12.11.19).
5. Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan / K. Naeem, A. Ullah, R. J. Manvell, D. J. Alexander // Vet. Rec. – 1999. – Vol. 145 (19). – P. 560; DOI: 10.1136/vr.145.19.560.
6. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia / Y. J. Guo, S. Krauss, D. A. Senne [et al.] // Virology. – 2000. – Vol. 267 (2). – P. 279–288; DOI: 10.1006/viro.1999.0115.
7. Genesis of avian influenza H9N2 in Bangladesh / K. Shanmuganatham, M. M. Feeroz, L. Jones-Engel [et al.] // Emerg. Microbes Infect. – 2014. – Vol. 3 (12):e88; DOI: 10.1038/emi.2014.84.

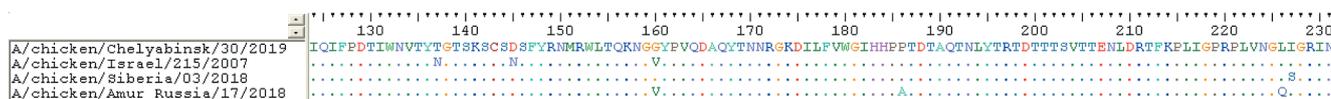


Рис. 2. Участок предсказанной аминокислотной последовательности рецептор-связывающего домена вирусного гемагглютинаина

8. Genetic characterization of HA gene of low pathogenic H9N2 influenza viruses isolated in Israel during 2006–2012 periods / I. Davidson, I. Shkoda, N. Golender [et al.] // *Virus Genes*. – 2013. – Vol. 46 (2). – P. 255–263; DOI: 10.1007/s11262-012-0852-4.

9. Genetic conservation of hemagglutinin gene of H9 influenza virus in chicken population in Mainland China / J.-H. Liu, K. Okazaki, A. Mweene [et al.] // *Virus Genes*. – 2004. – Vol. 29 (3). – P. 329–334; DOI: 10.1007/s11262-004-7436-x.

10. Genome sequencing and phylogenetic analysis of three avian influenza H9N2 subtypes in Guangxi / Z. Xie, J. Dong, X. Tang [et al.] // *Virolog. Sin.* – 2009. – Vol. 24 (1). – P. 37–44; DOI: 10.1007/s12250-009-2985-8.

11. Infection with avian influenza viruses // *Terrestrial Animal Health Code / OIE*. – 2019. – Vol. 2, Chap. 10.4. – URL: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-code/access-online> (дата обращения: 12.11.19).

12. Molecular evolution of H9N2 avian influenza viruses in Israel / I. Davidson, A. Fusaro, A. Heidari [et al.] // *Virus Genes*. – 2014. – Vol. 48 (3). – P. 457–463; DOI: 10.1007/s11262-014-1037-0.

13. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype / J. Banks, E. C. Speidel, P. A. Harris, D. J. Alexander // *Avian Pathol.* – 2000. – Vol. 29 (4). – P. 353–359; DOI: 10.1080/03079450050118485.

14. Senne D. A. Avian influenza in the Western Hemisphere including the Pacific Islands and Australia // *Avian Dis.* – 2003. – Vol. 47 (Suppl. 3). – P. 798–805; DOI: 10.1637/0005-2086-47.s3.798.

15. Spackman E. Influenza subtype identification with molecular methods // *Methods Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 1161. – P. 119–123; DOI: 10.1007/978-1-4939-0758-8_11.

16. Spackman E., Killian M. L. Avian influenza virus isolation, propagation, and titration in embryonated chicken eggs // *Methods Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 1161. – P. 125–140; DOI: 10.1007/978-1-4939-0758-8_12.

17. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus / J. Stevens, O. Blixt, T. M. Tumpey [et al.] // *Science*. – 2006. – Vol. 312 (5772). – P. 404–410; DOI: 10.1126/science.1124513.

18. Wan H., Perez D. R. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells // *J. Virol.* – 2007. – Vol. 81 (10). – P. 5181–5191; DOI: 10.1128/JVI.02827-06.

REFERENCES

1. A global perspective on H9N2 avian influenza virus. T. P. Peacock, J. James, J. E. Sealy, M. Iqbal. *Viruses*. 2019; 11 (7):e620; DOI: 10.3390/v11070620.

2. A novel genotype H9N2 influenza virus possessing human H5N1 internal genomes has been circulating in poultry in eastern China since 1998. P. Zhang, Y. Tang, X. Liu [et al.]. *J. Virol.* 2009; 83 (17): 8428–8438; DOI: 10.1128/JVI.00659-09.

3. Alexander D. J. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002–2006. *Avian Dis.* 2007; 51 (Suppl. 1): 161–166; DOI: 10.1637/7602-041306R.1.

4. Avian influenza (infection with avian influenza viruses). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE*. 2018; Chap. 3.3.4.

URL: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf (date of access: 12.11.19).

5. Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. K. Naeem, A. Ullah, R. J. Manvell, D. J. Alexander. *Vet. Rec.* 1999; 145 (19): 560; DOI: 10.1136/vr.145.19.560.

6. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. Y. J. Guo, S. Krauss, D. A. Senne [et al.]. *Virology*. 2000; 267 (2): 279–288; DOI: 10.1006/viro.1999.0115.

7. Genesis of avian influenza H9N2 in Bangladesh. K. Shanmuganatham, M. M. Feeroz, L. Jones-Engel [et al.]. *Emerg. Microbes Infect.* 2014; 3 (12):e88; DOI: 10.1038/emi.2014.84.

8. Genetic characterization of HA gene of low pathogenic H9N2 influenza viruses isolated in Israel during 2006–2012 periods. I. Davidson, I. Shkoda, N. Golender [et al.]. *Virus Genes*. 2013; 46 (2): 255–263; DOI: 10.1007/s11262-012-0852-4.

9. Genetic conservation of hemagglutinin gene of H9 influenza virus in chicken population in Mainland China. J.-H. Liu, K. Okazaki, A. Mweene [et al.]. *Virus Genes*. 2004; 29 (3): 329–334; DOI: 10.1007/s11262-004-7436-x.

10. Genome sequencing and phylogenetic analysis of three avian influenza H9N2 subtypes in Guangxi. Z. Xie, J. Dong, X. Tang [et al.]. *Virolog. Sin.* 2009; 24 (1): 37–44; DOI: 10.1007/s12250-009-2985-8.

11. Infection with avian influenza viruses. *Terrestrial Animal Health Code. OIE*. 2019; 2, Chap. 10.4. URL: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-code/access-online> (date of access: 12.11.19).

12. Molecular evolution of H9N2 avian influenza viruses in Israel. I. Davidson, A. Fusaro, A. Heidari [et al.]. *Virus Genes*. 2014; 48 (3): 457–463; DOI: 10.1007/s11262-014-1037-0.

13. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. J. Banks, E. C. Speidel, P. A. Harris, D. J. Alexander. *Avian Pathol.* 2000; 29 (4): 353–359; DOI: 10.1080/03079450050118485.

14. Senne D. A. Avian influenza in the Western Hemisphere including the Pacific Islands and Australia. *Avian Dis.* 2003; 47 (Suppl. 3): 798–805; DOI: 10.1637/0005-2086-47.s3.798.

15. Spackman E. Influenza subtype identification with molecular methods. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1161: 119–123; DOI: 10.1007/978-1-4939-0758-8_11.

16. Spackman E., Killian M. L. Avian influenza virus isolation, propagation, and titration in embryonated chicken eggs. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1161: 125–140; DOI: 10.1007/978-1-4939-0758-8_12.

17. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. J. Stevens, O. Blixt, T. M. Tumpey [et al.]. *Science*. 2006; 312 (5772): 404–410; DOI: 10.1126/science.1124513.

18. Wan H., Perez D. R. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells. *J. Virol.* 2007; 81 (10): 5181–5191; DOI: 10.1128/JVI.02827-06.

Поступила 13.10.19
Принята в печать 20.11.19