



# Генетический анализ нуклеотидных последовательностей гена нейраминидазы изолятов вируса высокопатогенного гриппа птиц А/Н5N8, выделенных на территории Российской Федерации в 2020 году

П. Б. Акшалова<sup>1</sup>, Н. Г. Зиняков<sup>2</sup>, А. В. Андриясов<sup>3</sup>, П. Д. Жестков<sup>4</sup>, З. Б. Никонова<sup>5</sup>, С. Н. Колосов<sup>6</sup>, И. А. Чвала<sup>7</sup>

<sup>1</sup> ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт» (ТОО «КазНИВИ»), г. Алматы, Казахстан

<sup>2-7</sup> ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1520-1887>, e-mail: [peri.akshalova@gmail.com](mailto:peri.akshalova@gmail.com)

<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>, e-mail: [zinyakov@arriah.ru](mailto:zinyakov@arriah.ru)

<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6314-2119>, e-mail: [andriyasov\\_av@arriah.ru](mailto:andriyasov_av@arriah.ru)

<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8204-280X>, e-mail: [zhestkov@arriah.ru](mailto:zhestkov@arriah.ru)

<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0090-9399>, e-mail: [nikonova@arriah.ru](mailto:nikonova@arriah.ru)

<sup>6</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8467-180X>, e-mail: [kolosov@arriah.ru](mailto:kolosov@arriah.ru)

<sup>7</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, e-mail: [chvala@arriah.ru](mailto:chvala@arriah.ru)

## РЕЗЮМЕ

Грипп птиц является особо опасной болезнью вирусной этиологии, наносящей огромный экономический ущерб птицеводству. В настоящее время в популяциях домашних и диких птиц в различных странах мира достаточно часто выявляют высоковирулентный вирус гриппа с нейраминидазой подтипа N8. В статье представлены данные по изучению полных нуклеотидных последовательностей гена нейраминидазы изолятов вируса высокопатогенного гриппа птиц, выделенных во второй половине 2020 г. из патологического материала, поступившего из четырех регионов Российской Федерации. В результате проведенных исследований определен подтип выделенного вируса – N8. Согласно данным филогенетического анализа, изоляты вируса N8 относятся к группе 8С.4. При проведении филогенетического анализа по нейраминидазе также учитывали данные классификации по гемагглютину, согласно которой изоляты вируса H5N8 относятся к широко распространенной кладе 2.3.4.4. Вирусы данной клады впервые зарегистрированы в 2010 г. в Китае и продолжают циркулировать до настоящего времени. Также в работе приведены данные сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей исследуемых изолятов и изолятов из международных баз данных GenBank и GISAID, выделенных в других странах в период с 2007 по 2020 г. В ходе проведения анализа аминокислотной последовательности исследуемых изолятов в позициях, которые влияют на резистентность к ингибиторам нейраминидаз, замен не обнаружено. Полные нуклеотидные последовательности гена нейраминидазы вируса гриппа птиц подтипа N8 изолятов A/domestic goose/Omsk/1521-1/2020, A/duck/Chelyabinsk/1207-1/2020, A/duck/Saratov/1578-2/2020, A/goose/Tatarstan/1730-2/2020 опубликованы в международных базах GenBank и GISAID. На основании анализа нуклеотидных последовательностей изученных изолятов показана постепенная эволюция вируса подтипа N8.

**Ключевые слова:** вирус гриппа птиц, ОТ-ПЦР, секвенирование, подтип нейраминидазы N8, филогенетический анализ, H5N8

**Благодарности:** Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

**Для цитирования:** Акшалова П. Б., Зиняков Н. Г., Андриясов А. В., Жестков П. Д., Никонова З. Б., Колосов С. Н., Чвала И. А. Генетический анализ нуклеотидных последовательностей гена нейраминидазы изолятов вируса высокопатогенного гриппа птиц А/Н5N8, выделенных на территории Российской Федерации в 2020 году. *Ветеринария сегодня*. 2021; 10 (4): 301–307. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-10-4-301-307.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Акшалова Перизат Батырханкызы, кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник отдела эпизоотологического мониторинга и оценки рисков вирусных болезней животных ТОО «КазНИВИ», 050000, Республика Казахстан, г. Алматы, проспект Райымбека, 223, e-mail: [peri.akshalova@gmail.com](mailto:peri.akshalova@gmail.com).

## Genetic analysis of nucleotide sequences of neuraminidase gene of highly pathogenic avian influenza A/H5N8 virus isolates recovered in the Russian Federation in 2020

P. B. Akshalova<sup>1</sup>, N. G. Zinyakov<sup>2</sup>, A. V. Andriyasov<sup>3</sup>, P. D. Zhestkov<sup>4</sup>, Z. B. Nikonova<sup>5</sup>, S. N. Kolosov<sup>6</sup>, I. A. Chvala<sup>7</sup>

<sup>1</sup> LLP "Kazakh Scientific-Research Veterinary Institute", Almaty, Kazakhstan

© Акшалова П. Б., Зиняков Н. Г., Андриясов А. В., Жестков П. Д., Никонова З. Б., Колосов С. Н., Чвала И. А., 2021

<sup>2-7</sup> FGBI “Federal Centre for Animal Health” (FGBI “ARRIAH”), Vladimir, Russia

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1520-1887>, e-mail: [peri.akshalova@gmail.com](mailto:peri.akshalova@gmail.com)

<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>, e-mail: [zinyakov@arriah.ru](mailto:zinyakov@arriah.ru)

<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6314-2119>, e-mail: [andriyasov\\_av@arriah.ru](mailto:andriyasov_av@arriah.ru)

<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8204-280X>, e-mail: [zhestkov@arriah.ru](mailto:zhestkov@arriah.ru)

<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0090-9399>, e-mail: [nikonova@arriah.ru](mailto:nikonova@arriah.ru)

<sup>6</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8467-180X>, e-mail: [kolosov@arriah.ru](mailto:kolosov@arriah.ru)

<sup>7</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, e-mail: [chvala@arriah.ru](mailto:chvala@arriah.ru)

## SUMMARY

Avian influenza is a highly dangerous viral disease that causes huge economic damage to poultry farming. Currently, highly virulent influenza virus with N8 neuraminidase subtype is quite often detected in populations of domestic and wild birds in various countries of the world. The article provides data on complete nucleotide sequences of the neuraminidase gene of highly pathogenic avian influenza virus isolates recovered in the second half of 2020 from pathological material received from four regions of the Russian Federation. The conducted research showed that the subtype of the isolated virus was N8. According to the phylogenetic analysis, isolates of N8 virus belong to group 8C.4. During the phylogenetic analysis of the neuraminidase, we also took into account data on hemagglutinin classification, according to which H5N8 virus isolates belong to a widespread clade 2.3.4.4. Viruses of the clade were first registered in 2010 in China and they have been circulating up to now. The paper also provides data of a comparative analysis of nucleotide sequences of the studied isolates and the isolates from the international GenBank and GISAID databases, recovered in other countries from 2007 to 2020. During the analysis of the amino acid sequence of the studied isolates, no substitutions were found in the positions that affect resistance to neuraminidase inhibitors. The complete nucleotide sequences of the neuraminidase gene of the avian influenza virus subtype N8 (isolates A/domestic goose/OMSK/1521-1/2020, A/duck/Chelyabinsk/1207-1/2020, A/duck/Saratov/1578-2/2020, A/goose/Tatarstan/1730-2/2020) are published in the international GenBank and GISAID databases. Based on the analysis of the nucleotide sequences of the studied isolates, the article shows gradual evolution of the N8 subtype virus.

**Keywords:** avian influenza virus, RT-PCR, sequencing, N8 neuraminidase subtype, phylogenetic analysis, H5N8

**Acknowledgements:** The study was funded by the FGBI “ARRIAH” within the framework of “Veterinary Welfare” research work.

**For citation:** Akshalova P. B., Zinyakov N. G., Andriyasov A. V., Zhestkov P. D., Nikonova Z. B., Kolosov S. N., Chvala I. A. Genetic analysis of nucleotide sequences of neuraminidase gene of highly pathogenic avian influenza A/H5N8 virus isolates recovered in the Russian Federation in 2020. *Veterinary Science Today*. 2021; 10 (4): 301–307. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-10-4-301-307.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**For correspondence:** Perizat B. Akshalova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Researcher, Department of Epidemiological Monitoring and Risk Assessment of Viral Animal Diseases, LLP “Kazakh Scientific-Research Veterinary Institute”, 050000, Republic of Kazakhstan, Almaty, prospekt Raiymbeka, 223, e-mail: [peri.akshalova@gmail.com](mailto:peri.akshalova@gmail.com).

## ВВЕДЕНИЕ

Неблагополучная ситуация по высокопатогенному гриппу птиц (ВПП) наблюдается в течение многих лет по всему миру. Начиная с 1996 г. эпизоотическое распространение получил высоковирулентный вирус гриппа птиц (ВГП) подтипа H5N1, выделенный от домашних гусей на одной из ферм в провинции Guangdong (Китай) [1]. В связи с заносом болезни на территорию Российской Федерации в 2005 г. и причинением значительного ущерба птицеводству страны были разработаны современные методы диагностики [2], в первую очередь предназначенные для выявления вируса A/H5N1. В период с 2016 по 2020 г. в России и во многих странах Азии, Африки и Европы регулярно регистрировали вспышки ВПП, вызванные вирусом подтипа H5N8.

Одно из первых упоминаний о ВПП подтипа H5N8 относится к 1983 г., когда вирус был выявлен у индеек в Ирландии [3, 4]. Следующий случай обнаружения вируса гриппа подтипа H5N8 зафиксирован в 2001 г. у диких птиц в штате Нью-Джерси (США) во время мониторинга окружающей среды, и с тех

пор в стране было зарегистрировано несколько спорадических случаев ВПП. После обнаружения в 2014 г. в Корее трех изолятов ВГП: A/breeder duck/Korea/Gochang1/2014 (H5N8), A/duck/Korea/Buan2/2014 (H5N8) и A/Baikal Teal/Korea/Donglim3/2014 (H5N8) – произошло глобальное распространение вируса подтипа H5N8 в США, а затем и в других странах Азии и Европы [5–8]. Индекс патогенности у данного вируса значительно выше, чем у вируса, выделенного в Ирландии [5]. По данным Y. J. Lee et al., высоковирулентные вирусы гриппа птиц подтипа H5N8, выявленные в Корее в 2014 г., произошли в результате реассортации вируса A/duck/Jiangsu/k1203/2010 (H5N8) с вирусами других подтипов, которые циркулировали в Китае в период с 2009 по 2012 г. [9]. Точное происхождение вируса, обнаруженного в 2010 г. в Китае, осталось неизвестным. K. Zhao et al. в своих исследованиях отмечают, что данный штамм, вероятно, представляет собой новый реассортант трех субтипов: H5N1 (высокая идентичность по генам PB1, PA, M, NS), H3N8 (по гену NA), H6N2 (ген NP) [10].

В конце 2016 г. эпизоотическая ситуация по высокопатогенному гриппу птиц на территории Российской Федерации обострилась. Так, с ноября по декабрь 2016 г. вспышки ВПП H5N8 среди домашних птиц были зарегистрированы в Астраханской, Ростовской областях, Краснодарском крае и Республике Калмыкия. В 2017 г. зафиксировано более 30 случаев выявления высоковирулентного вируса гриппа птиц подтипа H5N8 в стадах домашних птиц в 8 регионах: Ростовской, Московской, Нижегородской и Самарской областях, республиках Татарстан, Марий Эл, а также в Удмуртской и Чеченской республиках. В Краснодарском крае и Калининградской области установлены случаи гриппа у диких мигрирующих птиц, в Воронежской области – у птиц в зоопарке. Вспышки болезни нанесли огромный экономический ущерб промышленным хозяйствам Астраханской, Ростовской, Московской областей, Республики Татарстан [11].

В 2018 г. ВПП подтипа H5N8 был обнаружен у домашних птиц из Курской, Орловской, Воронежской, Смоленской, Саратовской, Самарской, Ульяновской, Пензенской, Нижегородской, Ростовской областей, республик Удмуртия, Марий Эл, Чувашия и Татарстан (более 80 случаев) [12].

Таким образом, вирусы гриппа подтипа H5N8, близкородственные первоначально выделенным в Южной Корее в начале 2014 г. изолятам, получили глобальное распространение. По информации, опубликованной МЭБ на 12 ноября 2020 г., зарегистрировано 265 вспышек высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5N8 (111 – среди домашних, 154 – среди диких птиц) в странах Европы, Азии и Африки [13], в том числе в 12 регионах РФ: Костромской, Курганской, Омской, Ростовской, Самарской, Саратовской, Томской, Тюменской, Челябинской областях, Ханты-Мансийском автономном округе – Югре, Республике Татарстан, Карачаево-Черкесской Республике.

Целью данной работы являлось проведение генетического анализа нуклеотидных последовательностей гена нейраминидазы подтипа N8 изолятов вируса высокопатогенного гриппа птиц, выделенных в РФ в 2020 г., для получения актуальных сведений о генетическом родстве изолятов ВПП.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирусы.** В работе были использованы изоляты вируса гриппа птиц подтипа H5N8:

– A/duck/Chelyabinsk/1207-1/2020 – выделен от домашней утки в селе Песчаное Увельского района Челябинской области в конце июля 2020 г.;

– A/domestic goose/Omsk/1521-1/2020 – выделен от домашнего гуся в поселке Иртышский Омского района Омской области в сентябре 2020 г.;

– A/duck/Saratov/1578-2/2020 – выделен от домашней утки в Энгельсском районе Саратовской области в сентябре 2020 г.;

– A/goose/Tatarstan/1730-2/2020 – выделен от домашнего гуся в селе Мещеряково Буинского района Республики Татарстан в октябре 2020 г.

Выделение вируса проводили в 10–11-суточных СПФ-эмбрионах кур.

**Праймеры.** В работе использовали несколько систем праймеров, предназначенных для выявления РНК ВПП подтипа N8 и определения полной нукле-

отидной последовательности гена нейраминидазы (NA) изолятов ВПП подтипа N8 (ЗАО «Синтол», Россия).

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

**Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).** Обратную транскрипцию с последующей амплификацией фрагментов гена NA для определения полной нуклеотидной последовательности изолятов ВПП подтипа N8 проводили в программируемых амплификаторах BioRad (Bio-Rad Laboratories, США). Синтез первой цепи комплементарной ДНК на вирусной РНК осуществляли с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы из вируса миелобластома птиц (AMV Reverse Transcriptase). Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкл 10 мМ dNTP, 5 мкл 5х буфера, 3 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 1 мкл 10 мкМ прямого и обратного праймера, 0,125 мкл фермента обратной транскриптазы (Promega, США), 0,25 мкл Taq-полимеразы, 8,625 мкл воды, свободной от РНКаз, 5 мкл раствора суммарной РНК. Для предотвращения испарения смеси поверх нее наслаивали 15 мкл минерального масла Mineral Oil Light White (MP Biomedicals, Франция). Реакционную смесь инкубировали в амплификаторе при 50 °С в течение 25 мин для наработки первой цепи кДНК. Далее прогревали при 95 °С в течение 10 мин. Последующие 39 циклов стандартной ПЦР проводили при следующем температурном режиме: денатурация при 95 °С – в течение 50 с, отжиг праймеров при 55 °С – в течение 50 с, элонгация при 72 °С – в течение 1 мин.

Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

**Очистка продуктов ПЦР.** Амплифицированные в ПЦР фрагменты кДНК очищали с помощью набора Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя.

**Секвенирование ДНК.** Определение первичной нуклеотидной последовательности фрагментов гена NA ВПП осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit, версия 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Для сравнения полных последовательностей гена NA выделенных изолятов использовали последовательности гена NA штаммов ВПП/N8, полученные из международных баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>) и GISAID.

Построение филогенетического дерева проводили с помощью алгоритма NJ (в том числе с использованием метода численного ресэмплинга бутстреп) в реализации пакета MEGA, версия 7.0.26.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из главных задач данного исследования было получение актуальных сведений о генетическом

родстве изолятов ВГП, выделенных в 2020 г. на территории РФ, а также их сравнение с другими ВГП подтипа N8.

На первом этапе работы были определены нуклеотидные последовательности гена нейраминидазы четырех выделенных изолятов вируса гриппа и проведен их сравнительный анализ с размещенными в международных базах данных последовательностями ВГП подтипа N8 из Евразии и Африки.

Как правило, при генетической характеристике вирусов гриппа птиц ориентируются на систему классификации по гемагглютинуину, которая была внедрена рабочей группой ВОЗ/МЭБ/ФАО и широко используется исследователями сообществом. Согласно литературным источникам, официальной регламентированной классификации по нейраминидазе не существует. Единственная публикация, где подробно описана классификация подтипов нейраминидазы, была подготовлена в 2012 г. американскими учеными из Университета Небраски [14]. Однако с тех пор произошли значительные генетические изменения вирусов гриппа птиц, получена большая масса новых данных, что ставит вопрос о дополнении предложенной системы классификации [15–17]. Введение официальной системы классификации вирусов является непростой задачей и требует тщательного анализа всех имеющихся в базе нуклеотидных последовательностей генов изолятов, проведения выравниваний, построения филогенетических деревьев и на их основе – обозначения клад и субклад. Еще более сложный вопрос – будет ли новая система номенклатуры вирусов принята и использована учеными, изучающими вирус гриппа.

По данным J. Xu et al., нейраминидаза подтипа N8 подразделяется на три линии, каждой из которых присвоено буквенное обозначение: 8A, 8B, 8C [14]. Линия 8A является «североамериканской», линия 8B представлена вирусами, выделенными от лошадей, а к 8C относится «евразийская» линия. Однако на сегодняшний день деления на линии явно недостаточно для описания вирусов, выявленных за несколько последних лет. Например, в данную классификацию не вошли вирусы подтипа H5N8, которые впервые были выделены в Китае в 2010 г. и впоследствии получили широкое распространение в Юго-Восточной Азии, а затем в России, Европе и Северной Америке. Поэтому при проведении филогенетического анализа выделенных в 2020 г. российских изолятов учитывали данные классификации и по нейраминидазе, и по гемагглютинуину, описанные в публикациях.

Для сравнительного и филогенетического анализов нуклеотидных последовательностей гена NA изолятов ВГП подтипа N8, полученных в настоящем исследовании, использовали последовательности известных штаммов данного подтипа, относящиеся к разным генетическим группам из баз данных GenBank и GISAID. В работе рассматривали 92 нуклеотидных последовательности гена нейраминидазы размером 1370 н. о.

На основе полных последовательностей гена NA ВГП подтипа N8 была построена дендрограмма (рис.), включающая вирусы, выделенные на территории Российской Федерации, Китая, Таиланда, Вьетнама, Кореи, Англии и других стран в период с 2007 по 2020 г. Статистическую достоверность топологии филогенетических деревьев проверяли с помощью бутстреп-анализа, вычисления проводили для 500 повторов.

Представленные в работе российские изоляты ВГП H5N8 на рисунке выделены красным шрифтом. Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена NA, показало наличие четырех различных групп. Исходя из классификации нейраминидазы, разработанной J. Xu et al., можно сделать вывод, что все использованные в исследовании изоляты относятся к «евразийской» линии 8C, которая по прошествии времени разделилась на несколько отдельных групп. Обозначение групп и подгрупп, отчетливо отраженных на дереве, было выполнено самостоятельно на примере классификации нейраминидазы других подтипов, также разработанной J. Xu et al. [14]. В результате каждой группе была присвоена нумерация, согласно которой первая группа названа 8C.1, вторая – 8C.2, третья и четвертая – 8C.3 и 8C.4 соответственно. В группы 8C.1, 8C.2 и 8C.3 вошли изоляты вируса низкопатогенного гриппа птиц.

В группу 8C.4 в основном вошли изоляты вируса высокопатогенного гриппа птиц, в том числе A/domestic goose/Omsk/1521-1/2020, A/duck/Saratov/1578-2/2020, A/duck/Chelyabinsk/1207-1/2020, A/goose/Tatarstan/1730-2/2020.

Согласно классификации по гемагглютинуину, группа изолятов 8C.4 сопоставима с субкладой 2.3.4.4.b клады 2.3.4.4.

Анализ изолятов вируса гриппа птиц подтипа H5N8, выделенных в 2020 г., демонстрирует значительно большую гетерогенность относительно группы изолятов, выявленных в 2016–2017 гг. Так, изоляты A/mute swan/Kazakhstan/1-267-20-B/2020, A/barnacle goose/Germany-SH/AI02167/2020, A/chicken/England/030720/2020, A/chicken/Netherlands/20016597-026030/2020, A/domestic goose/Omsk/1521-1/2020, A/duck/Saratov/1578-2/2020, A/duck/Chelyabinsk/1207-1/2020 формируют очень гомогенную группу, распространение которой, предположительно, связано с миграцией диких птиц. Степень отличия между данными изолятами составляет 0,1–0,6%. Однако стоит отметить, что изоляты A/domestic duck/Poland/285/2020 и A/Mandarin duck/Korea/H242/2020, выделенные в Польше и Южной Кореи, демонстрируют значительно большие различия (4,1–4,9%). Кроме этого, интересен факт выявления изолята A/goose/Tatarstan/1730-2/2020, демонстрирующего высокое сходство с выделенными в 2017 г. изолятами вируса гриппа птиц того же подтипа H5N8 и отличающегося от большинства изолятов 2020 г. Уровень отличий изолята A/goose/Tatarstan/1730-2/2020 от остальных изолятов, выявленных в 2020 г., составил 3,3%, а его генетическое сходство с изолятом A/swan/Voronezh/2/2017 составило 0,6%.

При проведении сравнительного анализа изолятов ВГП подтипа H5N8 установлено, что максимальный уровень различий нуклеотидной последовательности гена NA внутри группы 8C.4 составил 9%.

Также был проведен анализ аминокислотной последовательности исследуемых изолятов. В литературных источниках указывают несколько аминокислот, замены которых могут влиять на резистентность ВГП к препаратам, ингибирующим нейраминидазную активность (занамивир, осельтамивир): E119Q (117 нумерация по N8), R292K (291 по N8), V116D (114 по N8), либо потенциальную чувствительность к осельтамивиру и перамивиру: H274Y (273 по N8) [18–20]. Замен в предсказанной аминокислотной последовательности по вышеуказан-



Рис. Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена NA изолятов ВГП подтипа N8

Fig. Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of NA gene of HPAI subtype N8

ным позициям отмечено не было. Аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в каталитической активности фермента, остались без изменений: R118 (116 по N8), D151 (149 по N8), R152 (150 по N8), R292 (291 по N8).

Проведенные сравнительный и филогенетический анализы изолятов ВГП/N8 указывают на непрерывающуюся эволюцию вируса высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5N8 в различных географических регионах.

Полученные нуклеотидные последовательности гена нейраминидазы ВГП подтипа N8 изолятов A/domestic goose/Omsk/1521-1/2020, A/duck/Chelyabinsk/1207-1/2020, A/duck/Saratov/1578-2/2020, A/goose/Tatarstan/1730-2/2020 были опубликованы в международных базах данных GenBank и GISAID (MW276113, EPI1812535, EPI1811679, EPI1815193).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлены нуклеотидные последовательности гена NA изолятов вируса ВГП А/Н5N8: A/domestic goose/Omsk/1521-1/2020, A/duck/Chelyabinsk/1207-1/2020, A/duck/Saratov/1578-2/2020, A/goose/Tatarstan/1730-2/2020. Получены актуальные сведения о генетическом родстве по гену NA изученных изолятов ВГП подтипа N8 и изолятов, выделенных в период с 2007 по 2020 г. в РФ и других странах. Показана необходимость дополнения действующей классификации вирусов гриппа птиц внутри подтипа N8, обусловленная широким и быстрым распространением генетически близких вирусов гриппа птиц подтипа H5N8 в странах Европы, Азии, Африки в течение 2014–2017 гг.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Swayne D. E., Pantin-Jackwood M. Pathobiology of avian influenza virus infections in birds and mammals. In: *Avian Influenza*. Ed. by D. E. Swayne. Ames: Blackwell; 2008; 87–122.
- Мельнов С. Б., Лебедь Т. Л., Кипень В. Н. Основы молекулярно-генетического анализа. В кн.: *Современные проблемы биохимии. Методы исследований*. Е. В. Барковский и др.; под ред. проф. А. А. Чиркина. Минск: Вышэйшая школа; 2013; 404–438.
- Murphy T. M. The control and epidemiology of an influenza A outbreak in Ireland. In: *Acute Virus Infections of Poultry. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*. Eds. J. B. McFerran, M. S. McNulty. Dordrecht: Springer; 1986; 37: 23–28. DOI: 10.1007/978-94-009-4287-5\_2.
- El-Shesheny R., Barman S., Feeroz M., Hasan M., Jones-Engel L., Franks J., et al. Genesis of influenza A (H5N8) viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23 (8): 1368–1371. DOI: 10.3201/eid2308.170143.
- Марченко В. Ю., Сулопаров И. М., Колосова Н. П., Гончарова Н. И., Шиповалов А. В., Дурьманов А. Г. и др. Выделение высокопатогенного вируса гриппа А субтипа H5N8 на территории республики Саха (Якутия). *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2015; (28): 38–43. Режим доступа: <https://infectpataog.elpub.ru/jour/article/view/127/128>.
- Lee D. H., Torchetti M. K., Winker K., Ip H. S., Song C. S., Swayne D. E. Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds. *J. Virol.* 2015; 89 (12): 6521–6524. DOI: 10.1128/JVI.00728-15.
- Pohlmann A., Starick E., Harder T., Grund C., Höper D., Globig A., et al. Outbreaks among wild birds and domestic poultry caused by reassorted influenza A(H5N8) clade 2.3.4.4 viruses, Germany, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23 (4): 633–636. DOI: 10.3201/eid2304.161949.
- Dalby A. R., Iqbal M. The European and Japanese outbreaks of H5N8 derive from a single source population providing evidence for the dispersal along the long distance bird migratory flyways. *Peer J.* 2015; 3:e934. DOI: 10.7717/peerj.934.
- Lee Y. J., Kang H. M., Lee E. K., Song B. M., Jeong J., Kwon Y. K., et al. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20 (6): 1087–1089. DOI: 10.3201/eid2006.140233.
- Zhao K., Gu M., Zhong L., Duan Z., Zhang Y., Zhu Y., et al. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Vet. Microbiol.* 2013; 163 (3–4): 351–357. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.12.025.
- Волков М. С., Ирза В. Н., Варкентин А. В. Опыт ликвидации высокопатогенного гриппа птиц на территории Российской Федерации в 2016–2017 гг. *Ветеринария сегодня*. 2018; (1): 3–10. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-1-24-3-7.
- Волкова М. А., Чвала Ир. А., Ярославцева П. С., Сосипаторова В. Ю., Осипова О. С., Чвала И. А. Серологический мониторинг гриппа птиц в Российской Федерации в 2017–2018 годах. *Ветеринария сегодня*. 2019; (2): 3–11. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-2-29-3-7.
- World Animal Health Information and Analysis Department. Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI). Report No. 17: October 23 to Novem-

ber 12, 2020. Available at: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/hpai-asof12112020.pdf>.

14. Xu J., Davis C. T., Christman M. C., Rivaller P., Zhong H., Donis R. O., Lu G. Evolutionary history and phylodynamics of influenza A and B neuraminidase (NA) genes inferred from large-scale sequence analyses. *PLoS One.* 2012; 7 (7):e38665. DOI: 10.1371/journal.pone.0038665.

15. Kim Y. I., Pascua P. Q., Kwon H. I., Lim G. J., Kim E. H., Yoon S. W., et al. Pathobiological features of a novel, highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus. *Emerg. Microbes Infect.* 2014; 3 (10):e75. DOI: 10.1038/emi.2014.75.

16. Lee D. H., Sharshov K., Swayne D. E., Kurskaya O., Sobolev I., Kabilov M., et al. Novel reassortant clade 2.3.4.4 avian influenza A(H5N8) virus in wild aquatic birds, Russia, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23 (2): 359–360. DOI: 10.3201/eid2302.161252.

17. Liu M., Li X., Yuan H., Zhou J., Wu J., Bo H., et al. Genetic diversity of avian influenza A (H10N8) virus in live poultry markets and its association with human infections in China. *Sci. Rep.* 2015; 5:7632. DOI: 10.1038/srep07632.

18. Bialy D., Shelton H. Functional neuraminidase inhibitor resistance motifs in avian influenza A(H5Nx) viruses. *Antiviral Res.* 2020; 182:104886. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104886.

19. Oladejo B. O., Bi Y., Vavricka C. J., Li C., Chai Y., Xu K., et al. Structural insight into the mechanism of neuraminidase inhibitor-resistant mutations in human-infecting H10N8 influenza A virus. *bioRxiv.* 2018; 378075. DOI: 10.1101/378075.

20. Choi W. S., Jeong J. H., Kwon J. J., Ahn S. J., Lloren K. K. S., Kwon H. I., et al. Screening for neuraminidase inhibitor resistance markers among avian influenza viruses of the N4, N5, N6, and N8 neuraminidase subtypes. *J. Virol.* 2017; 92 (1):e01580-17. DOI: 10.1128/JVI.01580-17.

## REFERENCES

- Swayne D. E., Pantin-Jackwood M. Pathobiology of avian influenza virus infections in birds and mammals. In: *Avian Influenza*. Ed. by D. E. Swayne. Ames: Blackwell; 2008; 87–122.
- Mel'nov S. B., Lebed' T. L., Kipen' V. N. Osnovy molekulyarno-geneticheskogo analiza = Basics of molecular genetic analysis. In: *Sovremennyye problemy biokhimii. Metody issledovaniy = Modern problems of biochemistry. Test methods*. E. V. Barkovskii et al.; ed. by prof. A. A. Chirkin. Minsk: Vysheishaya shkola; 2013; 404–438. (in Russ.)
- Murphy T. M. The control and epidemiology of an influenza A outbreak in Ireland. In: *Acute Virus Infections of Poultry. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*. Eds. J. B. McFerran, M. S. McNulty. Dordrecht: Springer; 1986; 37: 23–28. DOI: 10.1007/978-94-009-4287-5\_2.
- El-Shesheny R., Barman S., Feeroz M., Hasan M., Jones-Engel L., Franks J., et al. Genesis of influenza A (H5N8) viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23 (8): 1368–1371. DOI: 10.3201/eid2308.170143.
- Marchenko V. Yu., Susloparov I. M., Kolosova N. P., Goncharova N. I., Shipovalov A. V., Durymanov A. G., et al. Isolation of highly pathogenic influenza A (subtype H5N8) virus on the territory of Republic of Sakha (Yakutia). *Dal'nevostochnyj zhurnal infekcionnoj patologii*. 2015; (28): 38–43. Available at: <https://infectpataog.elpub.ru/jour/article/view/127/128>. (in Russ.)
- Lee D. H., Torchetti M. K., Winker K., Ip H. S., Song C. S., Swayne D. E. Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds. *J. Virol.* 2015; 89 (12): 6521–6524. DOI: 10.1128/JVI.00728-15.
- Pohlmann A., Starick E., Harder T., Grund C., Höper D., Globig A., et al. Outbreaks among wild birds and domestic poultry caused by reassorted influenza A(H5N8) clade 2.3.4.4 viruses, Germany, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23 (4): 633–636. DOI: 10.3201/eid2304.161949.
- Dalby A. R., Iqbal M. The European and Japanese outbreaks of H5N8 derive from a single source population providing evidence for the dispersal along the long distance bird migratory flyways. *Peer J.* 2015; 3:e934. DOI: 10.7717/peerj.934.
- Lee Y. J., Kang H. M., Lee E. K., Song B. M., Jeong J., Kwon Y. K., et al. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20 (6): 1087–1089. DOI: 10.3201/eid2006.140233.
- Zhao K., Gu M., Zhong L., Duan Z., Zhang Y., Zhu Y., et al. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Vet. Microbiol.* 2013; 163 (3–4): 351–357. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.12.025.
- Volkov M. S., Irza V. N., Varkentin A. V. History of highly pathogenic avian influenza eradication in Russian Federation in 2016–2017. *Veterinary Science Today.* 2018; (1): 3–10. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-1-24-3-7.
- Volkova M. A., Chvala Ir. A., Yaroslavtseva P. S., Sosipatorova V. Yu., Osipova O. S., Chvala I. A. Serological monitoring for avian influenza in the Russian Federation in 2017–2018. *Veterinary Science Today.* 2019; (2): 3–7. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-2-29-3-7.

13. World Animal Health Information and Analysis Department. Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI). Report No. 17: October 23 to November 12, 2020. Available at: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/hpaia-2021122020.pdf>.
14. Xu J., Davis C. T., Christman M. C., Rivailier P., Zhong H., Donis R. O., Lu G. Evolutionary history and phylodynamics of influenza A and B neuraminidase (NA) genes inferred from large-scale sequence analyses. *PLoS One*. 2012; 7 (7):e38665. DOI: 10.1371/journal.pone.0038665.
15. Kim Y. I., Pascua P. Q., Kwon H. I., Lim G. J., Kim E. H., Yoon S. W., et al. Pathobiological features of a novel, highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus. *Emerg. Microbes Infect.* 2014; 3 (10):e75. DOI: 10.1038/emi.2014.75.
16. Lee D. H., Sharshov K., Swayne D. E., Kurskaya O., Sobolev I., Kabilov M., et al. Novel reassortant clade 2.3.4.4 avian influenza A(H5N8) virus in wild aquatic birds, Russia, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23 (2): 359–360. DOI: 10.3201/eid2302.161252.
17. Liu M., Li X., Yuan H., Zhou J., Wu J., Bo H., et al. Genetic diversity of avian influenza A (H10N8) virus in live poultry markets and its association with human infections in China. *Sci. Rep.* 2015; 5:7632. DOI: 10.1038/srep07632.
18. Bialy D., Shelton H. Functional neuraminidase inhibitor resistance motifs in avian influenza A(H5Nx) viruses. *Antiviral Res.* 2020; 182:104886. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104886.
19. Oladejo B. O., Bi Y., Vavricka C. J., Li C., Chai Y., Xu K., et al. Structural insight into the mechanism of neuraminidase inhibitor-resistant mutations in human-infecting H10N8 influenza A virus. *bioRxiv*. 2018; 378075. DOI: 10.1101/378075.
20. Choi W. S., Jeong J. H., Kwon J. J., Ahn S. J., Lloren K. K. S., Kwon H. I., et al. Screening for neuraminidase inhibitor resistance markers among avian influenza viruses of the N4, N5, N6, and N8 neuraminidase subtypes. *J. Virol.* 2017; 92 (1):e01580-17. DOI: 10.1128/JVI.01580-17.

Поступила в редакцию / Received 21.05.2021

Доработана после рецензирования / Revised 05.06.2021

Принята к публикации / Accepted 20.09.2021

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Акшалова Перизат Батырханкызы**, кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник отдела эпизоотологического мониторинга и оценки рисков вирусных болезней животных ТОО «КазНИВИ», г. Алматы, Республика Казахстан.

**Зиняков Николай Геннадьевич**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Андриясов Артем Валерьевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Жестков Павел Дмитриевич**, аспирант, ведущий технолог референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Никонова Зоя Борисовна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Колосов Сергей Николаевич**, кандидат биологических наук, сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Чвала Илья Александрович**, кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Perizat B. Akshalova**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Researcher, Department of Epidemiological Monitoring and Risk Assessment of Viral Animal Diseases, LLP "Kazakh Scientific-Research Veterinary Institute", Almaty, Republic of Kazakhstan.

**Nikolay G. Zinyakov**, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Artem V. Andriyosov**, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Pavel D. Zhestkov**, Post-Graduate Student, Leading Technologist, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Zoya B. Nikonova**, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Viral Avian Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Sergey N. Kolosov**, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Ilya A. Chvala**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.