

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК: 578.832.1:638.1

На правах рукописи

Онгарбаева Нурай Сырлыбаевна

**Молекулярно-биологические характеристики вирусов гриппа свиней,
циркулирующих в Казахстане**

6D060700 – Биология

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Отечественный научный консультант
к.б.н. Н.Г. Кливлеева

Зарубежный научный консультант
PhD, Директор
Сотрудничающего центра ВОЗ по изучению
экологии гриппа у животных и птиц,
Детский научный госпиталь им. Св.Иуды,
Мемфис, Теннесси (США)
Ричард Дж. Вебби

Республика Казахстан
Алматы, 2024

Содержание

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	5
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	6
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	7
ВВЕДЕНИЕ.....	9
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Систематическое положение, номенклатура и классификация вирусов гриппа	15
1.2 Строение и функции полипептидов вируса гриппа	17
1.3 Резервуары вируса гриппа А в природе.....	24
1.4 Дрейф и шифт вариации вирусов гриппа	25
1.5 Роль свиней в качестве резервуара вирусов гриппа	27
1.6 Взаимосвязь гриппа свиней и человека	30
1.7 Реассортантный вирус A(H1N1)pdm09 XXI столетия	33
1.8 Циркуляция вируса гриппа в популяции свиней на территории Казахстана	37
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1 Материалы исследования	43
2.1.1 Штаммы и сыворотки вирусов гриппа	43
2.1.2 Системы культивирования для изоляции вирусов гриппа	44
2.1.3 Лекарственные препараты.....	44
2.2 Методы исследования.....	44
2.2.1 Сбор носоглоточных смывов и венозной крови	44
2.2.2 Серологический анализ сывороток крови	45
2.2.3 Освобождение сывороток от неспецифических ингибиторов	45
2.2.4 Изоляция и клонирование вирусов гриппа.....	45
2.2.5 Идентификация изолированных штаммов	46
2.2.6 Молекулярно-биологические методы исследования.....	46
2.2.6.1 Полимеразно-цепная реакция в режиме «реального времени».....	46
2.2.6.2 Подготовка ПЦР-продуктов к секвенированию	47
2.2.6.3 NGS секвенирование на платформе Illumina MiSeq.....	48

2.2.7 Методы изучения биологических свойств вирусов гриппа свиней.....	50
2.2.8 Чувствительность к различным концентрациям противовирусных препаратов.....	51
2.2.9 Изучение антигенных взаимосвязей штаммов вируса гриппа свиней ...	51
2.2.9.1 Концентрация вирусов.....	51
2.2.9.2 Определение концентрации белка.....	52
2.2.9.3 Получение иммунных сывороток.....	52
2.2.10 Получение лиофильновысушенных препаратов ВГ и сывороток к ним	53
2.2.11 Статистический анализ.....	53
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	54
3.1 Сбор биологических образцов от свиней в различных регионах Казахстана	54
3.2 Скрининг носоглоточных смывов и идентификация подтипов вирусов гриппа свиней	55
3.3 Серологический анализ сывороток крови	57
3.4 Изоляция и идентификация гемагглютинирующих агентов	58
3.5 Эволюционно-филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей казахстанских штаммов вируса гриппа свиней.....	60
3.5.1 Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов штаммов вируса гриппа свиней.....	60
3.5.2 Филогенетический анализ генов казахстанских штаммов вируса гриппа свиней	62
3.5.3 Мутации в генах казахстанских штаммов вируса гриппа свиней	73
3.6 Биологические свойства казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018-2019 гг.	88
3.6.1 Гемагглютинирующая и инфекционная активности казахстанских изолятов.....	88
3.6.2 Термочувствительность гемагглютинина и степень адсорбции и элюции вируса с эритроцитов	89
3.6.3 Спектр гемагглютинирующей активности штаммов вируса гриппа свиней	91
3.6.4 Чувствительность к сывороточным ингибиторам	93

3.6.5 Чувствительность к противовирусным препаратам	94
3.6.5.1 Эмбриотоксичность противогриппозных препаратов на куриных эмбрионах.....	95
3.6.5.2 Чувствительность казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018-2019 гг. к различным концентрациям противогриппозных препаратов	96
3.7 Антигенные взаимосвязи казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018 – 2019 гг.....	98
3.8 Получение лиофильновысушенных препаратов казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018-2019 гг. и сывороток к ним и испытание их чувствительности и специфичности	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	107
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	126
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	127

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:
Закон Республики Казахстан «О науке» от 18.02.2011г. №407-IVЗРК;

ГОСО РК 5.04.034-2011. Государственный общеобразовательный стандарт образования Республики Казахстан. Послевузовское образование. Докторантура. Основные положения (изменения от 23 августа 2012г. №1080);

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации использованы следующие термины с соответствующими определениями:

Адьювант – вещество, неспецифический агент, усиливающий иммунный ответ на антигены.

Иммунизация – создание искусственного иммунитета – активного (при введении вакцин и анатоксинов) или пассивного (при введении сывороток или гамма-глобулинов).

Культивирование вируса – выращивание вируса в искусственных условиях путем заражения животных, культур клеток и тканей в диагностических целях (выделение от больных и носителей), при экспериментальной работе (изучение вируса), для производства вирусных вакцин и диагностикумов.

Перевиваемая линия – культуры клеток, сохраняющие способность к размножению вне организма (*in vitro*) неопределенно длительное время.

Секвенирование (от англ. *sequence* — «последовательность») - это общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК.

Титр вируса – наибольшее разведение, при котором еще наблюдается агглютинация эритроцитов.

Эпизоотический мониторинг - это сбор данных, анализ и прогноз эпизоотического состояния определенных территорий в связи с хозяйственной деятельностью человека. Выявление возбудителей болезней животных и их количество, а также определяются условия, способствующие или препятствующие распространению этих болезней.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АЕ	- агглютинирующая единица
ВОЗ	- Всемирная организация здравоохранения
ВГ	- вирус гриппа
ВГ(А)	- вирус гриппа А
ВГ(В)	- вирус гриппа В
ВГ(С)	- вирус гриппа С
ВГ(D)	- вирус гриппа D
ВГП	- вирус гриппа птиц
ВГС	- вирус гриппа свиней
ВПВГП	- высокопатогенный вирус гриппа птиц
ГА	- гемагглютинирующая активность
ГАА	- гемагглютинирующий агент
ГАЕ	- гемагглютинирующая единица
ГЭ	- геномный эквивалент
ИФА	- иммуноферментный анализ
КК	- культура клеток
КЭ	- куриные эмбрионы
НПВГП	- низкопатогенный вирус гриппа птиц
МЭБ	- Международное эпизоотическое бюро, переименовано в 2003 г. во Всемирную организацию здоровья животных
МЗ РК	- Министерство здравоохранения Республики Казахстан
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (reverse transcription polymerase chain reaction)
ООО	- общество с ограниченной ответственностью
ППДП	- предприятие по производству диагностических препаратов
РТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time polymerase chain reaction)
РК	- Республика Казахстан
РКЭ	- развивающиеся куриные эмбрионы
РГА	- реакция гемагглютинации
РТГА	- реакция торможения гемагглютинации
РИНА	- реакция ингибции нейраминидазной активности
СПЭВ	- линия клеток почки эмбриона свиньи (свиные почки эмбриональные, версенизированные)
ТЦД ₅₀	- 50%-ная тканевая цитопатическая доза
ТОО	- Товарищество с ограниченной ответственностью
ФАО	- Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций (FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations)
ФБУН ЦНИИ	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»

ФБР	- фосфатно-буферный раствор
ЭИД ₅₀	- 50%-ная эмбриональная инфекционная доза
ЦПД	- цитопатическое действие
lg	- десятичный логарифм
HA	- гемагглютинин
MDCK	- перевиваемая линия клеток почки собаки (Madin-Darby canine kidney cells)
M	- матричный белок
NA	- нейраминидаза
NP	- нуклеопротеин
NS	- неструктурный белок
NGS	- секвенирование нового поколения (Next Generation Sequencing)
Seq PCR	-сиквенс ПЦР
SRA	- Архив считывания последовательностей (Sequence Read Archive)
sw	- свиной
TRsw	- тройной реассортант вируса гриппа свиней
Csw	- классический вирус гриппа свиней
EAsw	- евроазиатский вирус гриппа свиней
BV-BRC	- ресурсный центр бактериальной и вирусной биоинформатики - это информационная система, предназначенная для поддержки работы сообщества биомедицинских исследователей в области бактериальных и вирусных инфекционных заболеваний путем интеграции информации о патогенах и инструментами анализа (https://www.bv-brc.org/).

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика диссертационного исследования. Работа посвящена идентификации и изоляции циркулирующих на территории Республики Казахстан штаммов вируса гриппа свиней (ВГС), изучению их молекулярно-биологических свойств и определению филогенетической принадлежности для выявления закономерностей их распространения и эволюции.

Актуальность исследования. ВГ(А) заражают различные виды млекопитающих и птиц. Свиньи в ряду животных, подверженных гриппу, занимают особое место, они являются одними из естественных хозяев этих вирусов. Грипп является очень важным респираторным заболеванием свиней, основными возбудителями являются ВГ(А) подтипов H1N1, H1N2 и H3N2, которые антигенно родственны человеческим ВГ. Свиньи восприимчивы к заражению птичьими и человеческими ВГ, и предполагается, что они играют важную роль в экологии гриппа человека.

Ко-инфекция двумя разными ВГ может привести к рекомбинации и появлению нового варианта вируса, потенциально значимого для общественного здравоохранения. Вирусные рецепторы различаются у млекопитающих и птиц, но у свиней есть рецепторы на клеточной поверхности, как для птичьих, так и для вирусов млекопитающих. Поэтому передача птичьих вирусов легче происходит в направлении свиней, чем людей. В результате внимание ученых сосредоточено на свиньях как на потенциальном «сосуде для смешивания». Свиньи часто находятся в тесном контакте с домашней птицей, в том числе околоводными видами, и людьми, особенно в Азии, где зарегистрировано появление многих новых штаммов вируса. Следовательно, заражение свиней несет в себе риск приобретения вирусами адаптации, необходимой либо для поддержания инфекции внутри поголовья свиней, тем самым обеспечивая дополнительный резервуар для инфекции человека, либо для обеспечения мутаций, необходимых для передачи от человека к человеку, что приведет к распространению этого вируса в человеческой популяции.

Установлено, что вирусы свиного гриппа, с момента своего появления многократно рекомбинировались с адаптированными к птицам и млекопитающим ВГ, что свидетельствует о совместимости генофонда птичьих, человеческих и свиных ВГ. Эти новые варианты могут в дальнейшем широко распространяться среди свиней и поэтому представлять угрозу для здоровья человека. Потенциальное сочетание обратного зооноза от человека к домашним животным и реассортация генов могут создать благоприятную экосистему для преодоления видового барьера между вирусами свиней и вирусами человека.

Свиной ВГ(А) H1N1/2009 (pdmH1N1), вызвавший пандемию в 2009 г., представляет собой генетическую модификацию четырех различных штаммов ВГ: сегмент гена гриппа человека, сегменты генов гриппа птиц и сегменты двух свиных вирусов Евразийской и Северо-Американской линий. Вызванная

этим вирусом первая пандемия ХХІ века еще раз доказала высокий риск межвидовой трансмиссии и частых эпизоотий в популяции свиней. Появление и установление линии пандемического гриппа H1N1 2009 г. среди людей и свиней создало прекрасную возможность для рекомбинации между современными и сезонными вирусами гриппа. В связи с быстрым распространением вируса среди свиного поголовья, вирусы H1N1 2009 г. существенно увеличили разнообразие генетического материала ВГ(А) свиней. Появились новые свиные реассортанты, зарегистрированные в Северной и Южной Америке, Азии и Европе.

В нынешних условиях развития свиноводства в РК (700 тыс. голов свиней на начало 2023 г.) систематический контроль и плановые диагностические исследования популяции свиней на предмет выявления циркулирующих среди них высококонтагиозных заболеваний (возбудителей гриппа), способных к трансграничному распространению, значительно возросли. Это связано с тем, что основное поголовье свиней на 1 мая 2021 г. сосредоточено в хозяйствах населения (в частных подворьях и мелкотоварных хозяйствах) – 571,6 тыс. голов, у индивидуальных предпринимателей и крестьянских или фермерских хозяйствах – 94,9 тыс. голов.

Эпиднадзор за новыми вариантами ВГ(А) H1N1pdm09, которые стали эндемичными у свиней, имеет важное значение для понимания динамической экологии ВГ(А) в популяциях свиней и людей. Систематический контроль и плановые диагностические исследования животных на предмет выявления циркулирующих среди них возбудителей гриппа, способных к трансграничному распространению, необходим для выявления эволюции ВГ как у свиней так и людей. Антигенная характеристика ВГ позволит понять генетические изменения и важна при подборе вакцинного штамма.

Несмотря на то, что изучение ВГ(А) у свиней продолжалось почти столетие, многие вопросы до сих пор остаются без ответа. Отсутствуют эффективные комплексные и систематические программы мониторинга и профилактики инфекции ВГ(А) у свиней как на региональном, национальном, так и на глобальном уровнях.

Таким образом, актуальность исследования определяется ключевой ролью свиней как природного резервуара для возбудителей гриппозной инфекции, базой для возникновения новых, потенциально опасных вариантов вирусов.

Объекты исследования: вирусы гриппа свиней, носоглоточные смывы, сыворотки крови.

Предмет исследования. Определение молекулярно-биологических свойств казахстанских изолятов вируса гриппа свиней.

Цель исследования. Изучение молекулярно-биологических характеристик и выявление изменчивости вирусов гриппа, циркулирующих в популяции свиней в Республике Казахстан.

Задачи исследования:

1. Молекулярно-биологический скрининг и изоляция штаммов ВГ из носоглоточных смывов, собранных от свиней в различных регионах Казахстана.

2. Филогенетический анализ переменных генов (гемагглютинин, нейраминидаза, NS и М) штаммов ВГС.

3. Сравнительное изучение биологических свойств и антигенных взаимосвязей штаммов ВГС.

4. Получение лиофильновысушенных препаратов штаммов ВГС и иммунных кроличьих сывороток к ним.

Методы исследования. Работа выполнена с применением современных сертифицированных вирусологических и молекулярно-биологических методов. Молекулярно-генетические исследования (NGS секвенирование на платформе Illumina MiSeq и секвенирование по технологии Сэнгера) проводились с использованием соответствующих методик и материально-технической базы лабораторий биохимии вирусов и молекулярной вирусологии ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии».

Научная новизна исследования

Впервые в животноводческих хозяйствах различных регионов Казахстана в эпидемические периоды с 2018 г. по 2021 г. проведено мониторинговое исследование и выявлена циркуляция двух подтипов ВГА: H1N1 и H3N2, с преобладанием ВГА H1N1.

Впервые из носоглоточных смывов, собранных от свиней в свиномкомплексах северного и алматинского регионов Казахстана, изолировано шесть штаммов.

Впервые определена и опубликована нуклеотидная последовательность полного генома ВГС А/свинья/Караганда/3/2020 (MZ396822.1 - MZ396828.1) и А/свинья/Караганда/4/2020 (MZ363969.1 - MZ363976.1) в международной базе данных GenBank.

Впервые установлена филогенетическая принадлежность штаммов ВГС А/свинья/Караганда/03/2020, А/свинья/Караганда/04/2020 к европейской ветви и изолятов ВГС А/свинья/Петропавловск/01/2018, А/свинья/Петропавловск/02/2018, А/свинья/Петропавловск/03/2018, А/свинья/Павлодар/43/2019 к азиатской ветви.

Впервые в структуре гена белка М2 карагандинских ВГС (03/20; 04/20) и алматинского штамма (45/19) обнаружена мутация S31N, отвечающая за формирование устойчивости к Ремантадину.

Проведено сравнительное изучение биологических свойств североказахстанских и алматинского штаммов ВГС 2018-2019 гг. с изолятами ВГС, циркулировавшими в свинофермах Костанайской и Актыбинской областях в 2012-2014 гг. и эталонными штаммами ВГ. Показана гетерогенность популяций ВГС 2018-2019 гг. по ряду биологических свойств.

Впервые изучена чувствительность североказахстанских и алматинского штаммов ВГС 2018-2019 гг. к современным противовирусным препаратам, входящим в государственный реестр лекарственных средств и медицинских изделий, и в клинический протокол диагностики и лечения гриппа и ОРВИ МЗ РК.

На штамм А/свинья/Петропавловск/03/18 (H1N1), предназначенный для производства диагностических препаратов, получен патент №34782 от 09.04.2021.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Накоплен огромный арсенал знаний об особенностях циркуляции ВГ и роли свиней в эволюции и трансмиссии этого патогена. Исследование молекулярно-биологических характеристик изолятов ВГ, изолированных от свиней, является фундаментальным вкладом в экологию гриппа. Кроме теоретической значимости диссертационная работа представляет и практическую ценность, связанную с возможностью использования штамма А/свинья/Петропавловск/03/18 (H1N1) для производства современных диагностических препаратов.

Оригинальный штамм ВГС А/свинья/Петропавловск/03/18 (H1N1) депонирован (регистрационный номер М-3-19/D от 27.03.2019) в национальной коллекции микроорганизмов РГП на ПХВ "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" МОН РК. На оригинальный штамм ВГС А/свинья/Петропавловск/03/18 (H1N1), предназначенный для производства диагностических препаратов, получен Патент (№34782 от 09.04.2021).

Лиофильновысушенные препараты казахстанских штаммов ВГА, циркулировавших в популяциях свиней в 2018-2019 гг., и иммунные сыворотки к ним, рекомендованы для применения в вирусологических лабораториях здравоохранения и ветеринарных служб республики для оценки напряженности коллективного иммунитета к гриппу и расшифровки возникающих вспышек ОРВИ и идентификации вновь выделенных изолятов ВГ.

В международной базе данных GenBank в свободном доступе находятся нуклеотидные последовательности всех генов ВГС А/свинья/Караганда/03/2020 и А/свинья/Караганда/04/2020 под номерами MZ396822.1 - MZ396828.1 и MZ363969.1 - MZ363976.1, что дает возможность использовать их для локального и глобального сравнительного филогенетического анализа со штаммами ВГ, циркулирующими в настоящий момент.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. В свинофермах различных регионов Казахстана в 2018 - 2021 гг. от свиней собрано 2144 биологических образцов. При скрининге образцов в ПЦР и РТГА установлена социркуляция ВГА H1N1 и H3N2. Из образцов, полученных из Северного и Южного регионов Казахстана, на КЭ и КК МДСК выделены пять штаммов вируса гриппа А/H1N1 и один А/H3N2.

2. Филогенетический анализ вариабельных генов (НА, NA и NS) штаммов ВГ, циркулировавших в популяциях свиней в РК в 2018 – 2020 гг., выявил принадлежность карагандинских ВГС (03/20; 04/20) к европейской ветви, а североказахстанских штаммов (43/19; 03/18; 02/18; 01/18) – к азиатской.

3. По основным биологическим свойствам изоляты представляют в основном однородную группу, проявляя гетерогенность по некоторым свойствам. Установлено близкое антигенное родство североказахстанских

штаммов (44/19; 43/19; 03/2018; 02/2018 и 01/2018) с эталонными ВГА H1N1 (A/New Jersey/8/76; A/swine/USA/1976/31 и A/swine/Iowa/15/30), алматинского штамма (45/19) – с вирусом A/Wisconsin/67/05(H3N2).

4. Лиофильно высушенные антигены ВГС 2018 – 2019 гг. и иммунные кроличьи сыворотки к ним сохраняли активность после шести-девяти месяцев хранения, что позволяет рекомендовать данные препараты для использования в качестве диагностических.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнена в рамках двух проектов: грантового финансирования МОН (МНВО) РК AP05130989 «Молекулярно-генетическая изменчивость вирусов гриппа свиней в Казахстане» (2018 - 2020 гг.) и международного ISTC K-2231 «Molecular characterization of swine influenza viruses circulating in different regions in Kazakhstan and comparison with contemporary human influenza viruses» (2018 - 2021 гг.) в ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии». Научный руководитель проектов – к.б.н. Н.Г. Кливлеева.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы опубликованы и доложены на трех международных научных конференциях: «Influenza 2018: Centenary of the 1918 Pandemic» (Лондон, 2018 г.); Конгресс «10th Edition of Options for the Control of Influenza» (Сингапур, 2019 г.); 22nd Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (Копенгаген, 2019 г.), в материалах международных научно-практических конференций ближнего зарубежья: «Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики» (Екатеринбург, 2018 г.); «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2018 г.) и Республики Казахстан: «Современные вызовы для биотехнологии, ветеринарии и медицины» (Гвардейский, 2020 г.), на ежегодных научных семинарах кафедры «Молекулярная биология и генетика» факультета «Биология и биотехнология» КазНУ им. аль-Фараби и частично включены в Отчеты о научно-исследовательской работе по проектам AP05130989, ISTC K-2231 и OR11465435-OT-22.

Публикации. Согласно требованиям Положения о диссертационном совете КазНУ им. аль-Фараби материалы диссертации отражены в 17 публикациях, в том числе 2 статьях в журналах, входящих в Q3 по базе Web of Science, 3 статьях в журналах, включенных в перечень Комитета по обеспечению качества в сфере образования Министерства науки и высшего образования РК (КОКСНВО МНВО РК), 3 тезисах в материалах международных конференций, 2 тезисах в материалах международных конференций в ближнем зарубежье и 1 тезисе в материалах международной конференции в Республике Казахстан. А также 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах и состоит из разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, заключение и выводы, список использованных источников, который включает 250 наименований, из них 200

на английском языке. Диссертационная работа содержит 30 таблиц, 32 рисунка и два приложения.

Диссертант выражает особую признательность научным руководителям к.б.н. Н.Г. Кливлеевой (заведующий лабораторией биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»), Р. Дж. Вебби (директор Сотрудничающего центра ВОЗ по изучению экологии гриппа у животных и птиц США, Мемфис, Теннесси), в.н.с., к.б.н. Т.И. Глебовой и сотрудникам лаборатории биохимии вирусов за помощь, оказанную при формулировании задач исследования, за консультативное содействие и осуществление верификации результатов в процессе выполнения работы, анализ и оформление результатов в виде публикаций и научных докладов. А также руководителям лаборатории вирусологии АО «Научный центр противоинфекционных препаратов» к.б.н. И.С. Коротецкому и лаборатории прикладной генетики РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК к.б.н. А.Б. Шевцову за содействие, оказанное при выполнении NGS секвенирования.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Систематическое положение, номенклатура и классификация вирусов гриппа

Вирусы гриппа принадлежат семейству *Orthomyxoviridae*, которое согласно классификации Международного комитета по вирусной таксономии включает семь родов *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Influenzavirus D*, *Thogotovirus*, *Isavirus* и *Quaranfilvirus* [1, 2]. Классификация семейства ортомиксовирусов приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Классификация ортомиксовирусов

Порядок	Семейство	Род	Вид
<i>Mononegavirales</i>	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus A</i>	<i>Influenza A virus</i>
		<i>Influenzavirus B</i>	<i>Influenza B virus</i>
		<i>Influenzavirus C</i>	<i>Influenza C virus</i>
		<i>Influenzavirus D</i>	<i>Influenza D virus</i>
		<i>Isavirus</i>	<i>Infectious salmon anemia virus</i>
		<i>Thogotovirus</i>	<i>Thogoto virus</i> <i>Dhori virus</i>
		<i>Quaranfilvirus</i>	<i>Quaranfil virus</i>

В настоящее время известно, что из всех родов вирусов гриппа, только ВГ(А) имеет широкий спектр хозяев, который включает в себя различные виды птиц и млекопитающих. ВГ(В) выделены от людей, тюленей [3] и свиней [4], ВГ(С) – от людей и свиней [5]. Распространение ВГ(С) среди людей происходит либо в форме локальных вспышек, либо имеет спорадический характер. Серологические признаки ВГ(С) были недавно обнаружены у верблюдов [6]. ВГ(D) выявлены у крупного рогатого скота и свиней [7]. Имеются сведения об обнаружении антител к ВГ(D) у мелких жвачных животных (коз и овец) [8]. Исследования показывают, что ВГ(D) может быть возбудителем заболевания людей, особенно среди фермеров, работающих с крупным рогатым скотом. Однако изолировать вирус из носоглоточных смывов человека пока не удалось [9]. *Isavirus* является возбудителем анемии у лососевых. Представители *Thogoto virus* были выделены в Африке от человека, клещей и зайцеобразных. *Dhori virus*, впервые был выделенный в Индии от клещей, а затем в Западной России, Египте и на юге Португалии; способен также инфицировать человека, вызывая энцефалопатию [10, 11]. Группа *Quaranfil virus* включает клещевые вирусы, обнаруженные у людей и птиц [12].

Классификация вирусов гриппа основана на антигенных различиях. Поверхностные белки ВГ(А) представлены 18 подтипами НА Н1-Н18 и 11 NA

N1-N11 [13, 14]. В таблице 2 показано распространение подтипов поверхностных белков вируса гриппа А.

Таблица 2 - Подтипы гемагглютиниана и нейраминидазы вируса гриппа А человека и животных

Гемагглютинин		Нейраминидаза	
Подтип	Носитель	Подтип	Носитель
H1	человек свинья птица	N1	человек свинья птица
H2	человек свинья птица	N2	человек свинья птица
H3	человек свинья лошадь птица тюлень	N3	птица тюлень
H4	птица	N4	птица
H5	птица	N5	птица
H6	птица	N6	птица
H7	лошадь птица тюлень	N7	лошадь птица
H8	птица	N8	лошадь птица тюлень
H9-H16	птица	N9	птица
H17-H18	летучая мышь	N10- N11	летучая мышь

В настоящее время известно множество вариантов вирусов как типа А, так и типа В. Была разработана международная система кодировки [15], по которой каждый вариант получил свое название, например:

A/California/04/09(H1N1),

где последовательно указаны: тип вируса гриппа (А, В или С), место выделения, порядковый номер выделенного в данном году и в данной лаборатории вируса, год выделения, антигенный подтип (в скобках), если вирус был выделен от животного, то после указания типа вируса указывается название животного, например:

A/swine/Iowa/15/30 (H1N1).

1.2 Структура и функции полипептидов вируса гриппа

Ортомиксовирусы (с греч.: *ortho* – прямой или правильный; *муха* – слизь) содержат линейную отрицательной полярности РНК, состоящую из 6-8 сегментов. Геномы ВГ(А) и ВГ(В) содержат восемь генных сегментов, тогда как геномы ВГ(С) и ВГ(D) имеют семь генных сегментов [16].

Возбудители гриппа А, В, С и D отличаются по основным внутренним антигенам - белкам NP и M1 [17]. Вирусы серотипов А и В, помимо этого, различаются двумя поверхностными гликопротеидами - HA и NA. Вирус гриппа С и D, в отличие от них, содержат только один тип оболочечного гликопротеида - HEF (*haemagglutinin-esterase fusion protein*) [18]. *Thogoto* и *Dhori* вирусы имеют единственный гликопротеид, который по строению отличается от известных белков остальных представителей рода *Influenza virus*.

ВГ(А) имеет округлую или продолговатую форму размером около 80-120 нм в диаметре и состоит из липидного бислоя с погруженными в него HA и NA (рисунок 1). За бислоем следует внутренняя оболочка, из М белка и с расположенным внутри нуклеокапсидом, состоящим из восьми фрагментов одноцепочной отрицательной вРНК в комплексе с РНК-зависимыми РНК полимеразой и NP. Такая РНК комплементарна иРНК и не способна непосредственно участвовать в синтезе белков. Поэтому в вирионе содержится также РНК-зависимая РНК полимераз (транскриптаза) – фермент, способный синтезировать иРНК, комплементарную вирусной, на основе которой осуществляется синтез вирусных белков в инфицированной клетке [19].

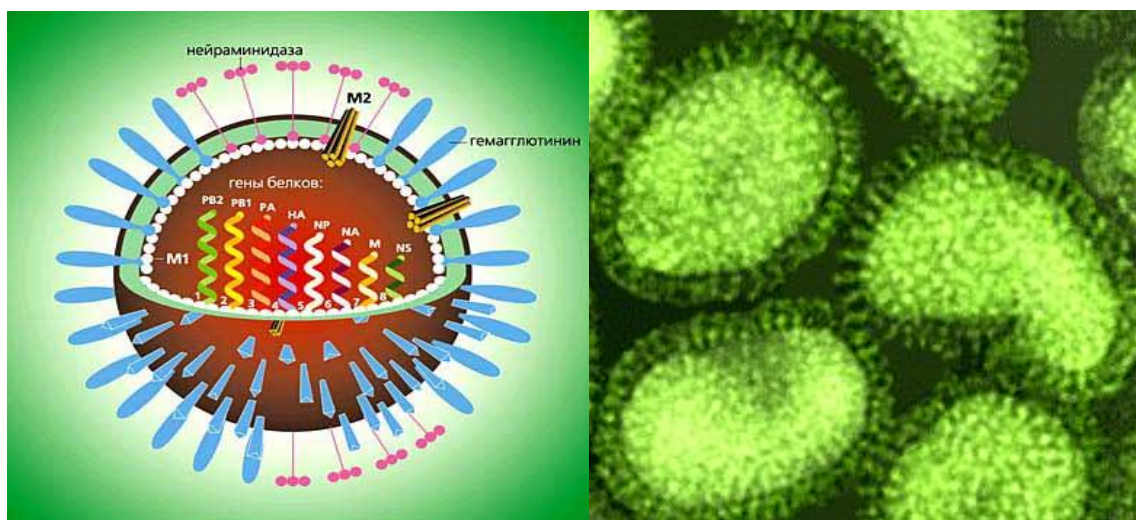


Рисунок 1 - Схема строения и электронная микрофотография вириона вируса гриппа А

Геном ВГ(А) содержит восемь сегментов отрицательной одноцепочечной РНК: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M и NS. Каждый из этих сегментов кодирует один белок, за исключением сегментов PB1, M и NS, где сегмент PB1 кодирует белок PB1, белок PB1-F2 и белок PB1-N40; сегмент M кодирует белок M1 и белок M2; сегмент NS кодирует белок NS1 и NS2 [1].

Полимеразная активность определяется тремя ферментами (РА, РВ1 и РВ2), участвующими в репродукции и считывании генетической информации с РНК. Все три полимеразных белка связаны только с одним концом каждого комплекса RNP [20, 21].

Кислотный (РА) и два основных (РВ1 и РВ2) протеина, закодированные тремя самыми крупными сегментами РНК, образуют комбинацию РВ1-РВ2 или РА-РВ1-РВ2 [22-24], которые содержат РНК-зависимую РНК полимеразу.

Гемагглютинин (НА) - является одним из самых крупных белков в вируоне. Он распределяется равномерно на поверхности вириона и составляет 25-35% массы всех белков. НА отвечает за прикрепление и последующее проникновение вируса в клетку посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза [25], поэтому его еще называют прикрепительным белком. Другой важной функцией НА является его участие в стадии проникновения вируса в клетку, в частности в процессе слияния клеточной мембраны с вирусной, а также стимуляции экспорта вирусного генома к месту сборки вируса.

НА представляет собой тример идентичных субъединиц, каждая из которых содержит два полипептида, которые возникают в результате протеолитического расщепления одного предшественника на две субъединицы: НА1 (319-328 аминокислот) и НА2 (221-222 аминокислот). Эти цепи ковалентно скреплены дисульфидной связью [26]. Мономеры соединены нековалентной связью в тримеры [27, 28] (рисунок 2, 3).

Гидрофобный N-конец НА2 высоко консервативен для разных штаммов. Ближе к С-концу гидрофобный домен, состоящий из 40 аминокислотных остатков, пронизывает липидный бислой вириона. Подмембранный гидрофильный домен НА2 состоит из 9-11 заряженных аминокислотных остатков.

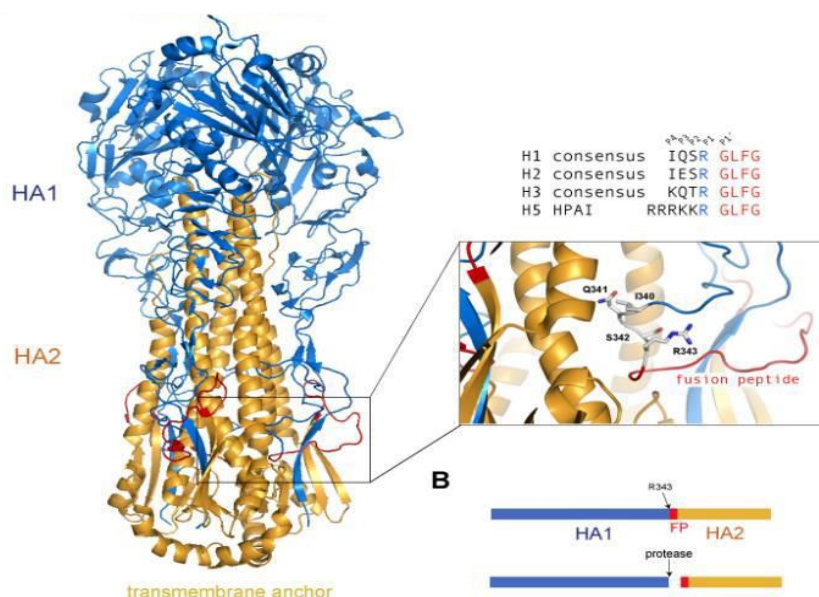


Рисунок 2 – Трехмерная структура гемагглютинаина [29]

Расщепление предшественника имеет важное значение для активации потенциала слияния мембран и, следовательно, инфекционной активности [30, 31]. Именно против НА направлены антитела, нейтрализующие инфекционность ВГ. Для НА большинства подтипов сайт расщепления представляет собой один остаток аргинина, и расщепление происходит внеклеточно еще не идентифицированным ферментом [32]. Однако некоторые представители подтипов Н5 и Н7 приобрели несколько основных остатков в месте расщепления [33], которые распознаются внутриклеточным субтилизиноподобным ферментом [34]. В этих случаях расщепление является эффективным, инфекционность вируса высока, а вирусы являются высокопатогенными [30, 31, 35]. Во всех случаях ферментативное расщепление генерирует N-конец «слитого пептида», консервативной незаряженной области НА [28], которая играет важную, но неопределенную роль в слиянии мембран.

Нейраминидаза (NA) – является вторым важнейшим поверхностным антигеном вириона ВГ, встроенным в мембрану. Основная функция NA – удаление сиаловой кислоты от НА, так как без этого процесса НА не может освободиться от поверхности клетки и участвовать в следующих стадиях репродукции вируса. Помимо этого NA участвует в освобождении вирусных частиц с поверхности клетки и способствует распространению вируса в организме.

NA представляет собой грибовидный тетрамер с молекулярной массой 200-250 тыс. Да, состоящий из идентичных субъединиц с головкой гриба, подвешенной к вирусной мембране на тонком стебле длиной 60 Å. Длина варьирует между штаммами вируса (рисунок 3). Каждая из субъединиц, образующих головку гриба, состоит из шестилопастной конструкции, похожей на пропеллер, лопасти которой образованы четырьмя антипараллельными нитями β -структуры [36, 37]. Активный сайт фермента, содержащий ряд консервативных заряженных аминокислотных остатков, расположен примерно в центре каждой субъединицы [26, 37]. Как и в случае НА, мономеры NA соединены между собой дисульфидными связями, которые находятся внутри мономера и стабилизируют структуру этого белка. Дисульфидных связей в структуре NA больше, чем в структуре НА. Молекула NA состоит из 464 аминокислотных остатков. На N-конце молекулы находится гидрофобная область из 29 аминокислотных остатков. Первые 6-10 аминокислотных остатков образуют цитоплазматический «хвост», который, так же как и в структуре НА, играет важную роль в сборке вирусных частиц, упаковке вирусного генома и транспорте вновь синтезированных молекул к клеточной поверхности. Далее следуют трипсин чувствительные сайты в положениях 57 (лизин) и 63 (аргинин). У C-конца молекулы гидрофобной области не обнаружено (в отличие от НА). Имеются также данные, что C-конец молекулы NA выполняет важную функциональную роль в процессе репродукции ВГ, в частности участвует в процессе расщепления вновь синтезированной молекулы НА [36-38].

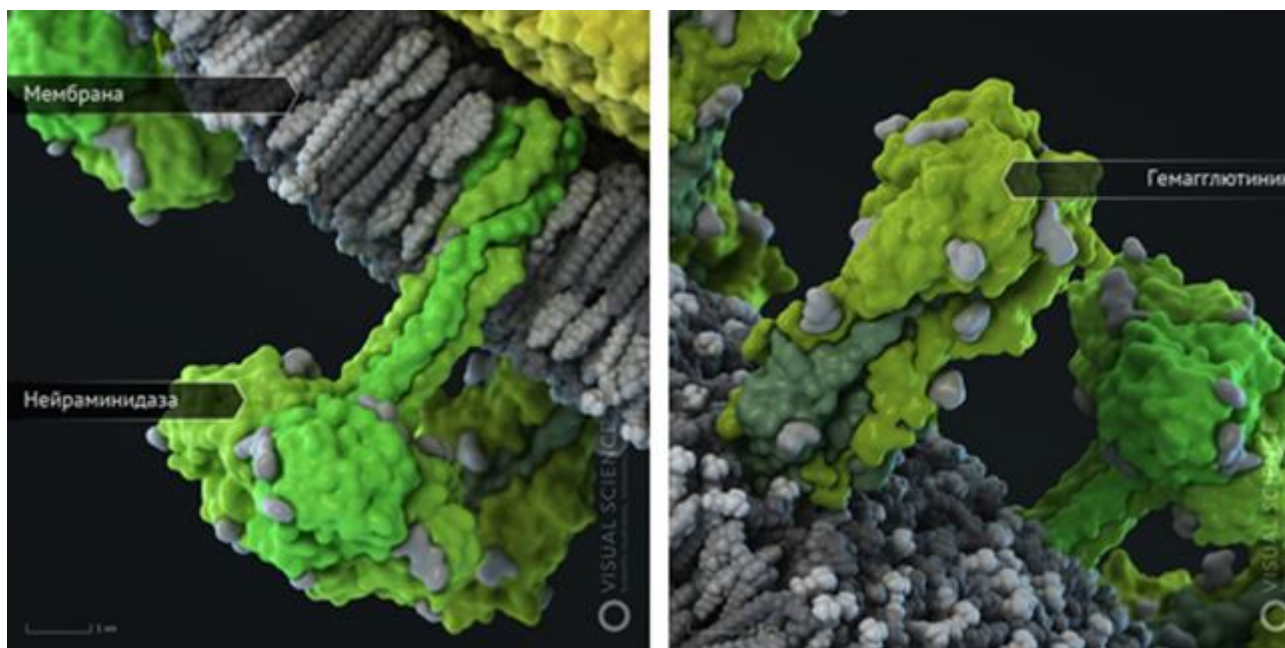


Рисунок 3 - Трехмерная модель поверхностных белков вируса гриппа [39]

Мембранный белок M2 – это небольшой трансмембранный белок с молекулярной массой 11 тыс. Да, который состоит из 97 аминокислотных остатков и кодируется сплайсированной мРНК (рисунок 4) [40].

В то время как белок M2, обильно экспрессируется на плазматической мембране инфицированных вирусом клеток, он является сравнительно второстепенным компонентом вирионов [33]. В структуре белка M2 имеются три функционально важные области: N-терминальный конец – эктодомен - включает 23 аминокислотных остатка для вирусов гриппа типа А и 7 аминокислотных остатков для вирусов гриппа В; далее расположены 20 аминокислотных остатков, относящихся к трансмембранному домену, С-фрагмент – цитоплазматический «хвост», включающий 53 аминокислотных остатка для вирусов гриппа А и 83 аминокислотных остатка для вирусов гриппа В. Основная функция белка M2 (область эктодомена и трансмембранного домена) заключается в создании ионного канала, регулирующего pH в процессе разведения вируса в эндосомах и в аппарате Гольджи – месте синтеза НА. В этих случаях создание кислых pH является необходимым условием для разведения вируса и стабилизации конформации НА во время его внутриклеточного транспорта. Вирусы с дефектом активности ионного канала в белке M2 способны репродуцироваться, но эффективность репродукции резко снижена. В последнее время получены данные о том, что M2 (область цитоплазматического «хвоста») играет важную роль не только в создании ионного канала, но и в процессах упаковки вирионной РНК, отпочковывания вириона, в определении морфологии вирусной частицы. Кроме этого, оказалось, что белок M2 способен блокировать слияние аутофагосом с лизосомами клетки. Мутации в эктодоме и трансмембранном домене, изменяющие количество аминокислотных остатков в цитоплазматическом

«хвосте», сказывающиеся на проявлении вирулентных и иммуногенных свойств вируса.

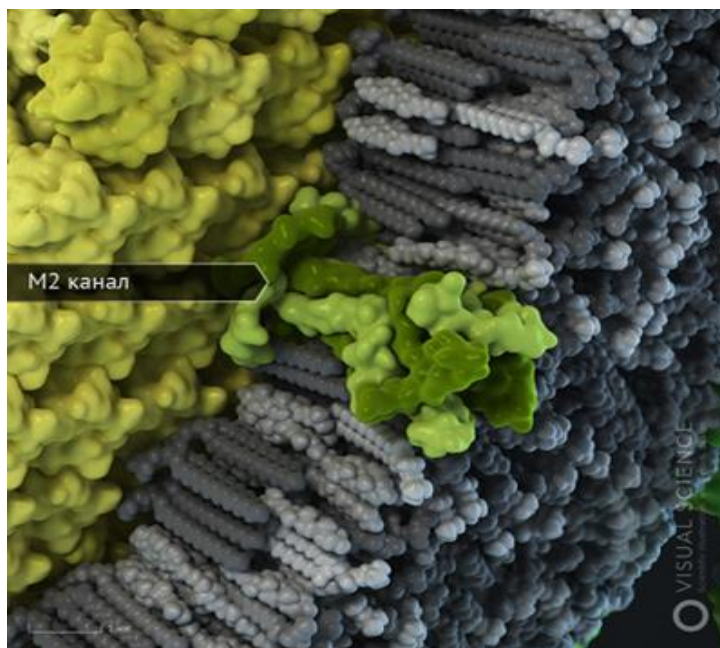


Рисунок 4 - Трехмерная модель белка M2, встроенного в мембрану вириона вируса гриппа [39].

Мембранный белок M1 выстилает внутреннюю поверхность липидного слоя. Доля белка M1 составляет около 40% всей массы белка вириона. Молекулярная масса этого белка 25 тыс. Да, он гидрофобен и образует слой толщиной 35-40 Å. При сборке вирусной частицы в клетке гликопротеины точно находят место нахождения белка M1, что указывает на взаимосвязь HA, NA и M1-белка. Контакт M1-белка с цитоплазматическими «хвостами» поверхностных гликопротеинов возможно является результатом их электростатического взаимодействия. Кроме того, M1-белок взаимодействует с внутренними компонентами вируса, в частности с РНК и NP. Взаимодействие M1 – белка с NP осуществляется с помощью его С-конца (165-252 аминокислотные остатки). Таким образом, очевидно, что M1-белок играет существенную роль в детерминации формы вириона в процессе его сборки и отпочковывания. Также M1-белок выполняет важные регуляторные функции в процессе репродукции вируса, участвует в поддержании pH. Он контролирует транскрипцию vРНК и нуклеоцитоплазматический транспорт РНП в зараженной клетке. Участие M1-белка в нуклеоцитоплазматическом транспорте РНП определяется наличием сигнала ядерной локализации в его структуре. Помимо сигнала ядерной локализации для выполнения M1-белком транспортных функций важен и процесс фосфорилирования этого белка, который происходит с участием клеточного фермента протеинкиназы С.

Нуклеопротеин (NP) – внутренний белок вириона, занимающий центральную роль в репликации вируса [41]. Как структурный белок, не обладающий собственной ферментативной активностью - это самый

распространенный вирусный белок в инфицированных клетках. NP является важным компонентом комплекса ВРНП и участвует в организации упаковки РНК и в ядерном переносе ВРНК [42-45].

NP является основным белком, обогащенным аргининовыми остатками, имеет положительный заряд +14 при рН 6.5, в вирионе содержатся около 1000 его молекул. РНК находятся снаружи РНП [41] (рисунок 5).

NP - многофункциональный белок, взаимодействует в составе РНП с самим собой, с ВРНК, с белками PB2, PB1 и PA образует транскриптазный комплекс [46]. В зараженных клетках роль NP сводится к антитерминаторному действию в точках терминации вирусных мРНК [47].

NP является родоспецифическим белком вирусов гриппа, а также играет ключевую роль в определении видовой специфичности [48, 49].

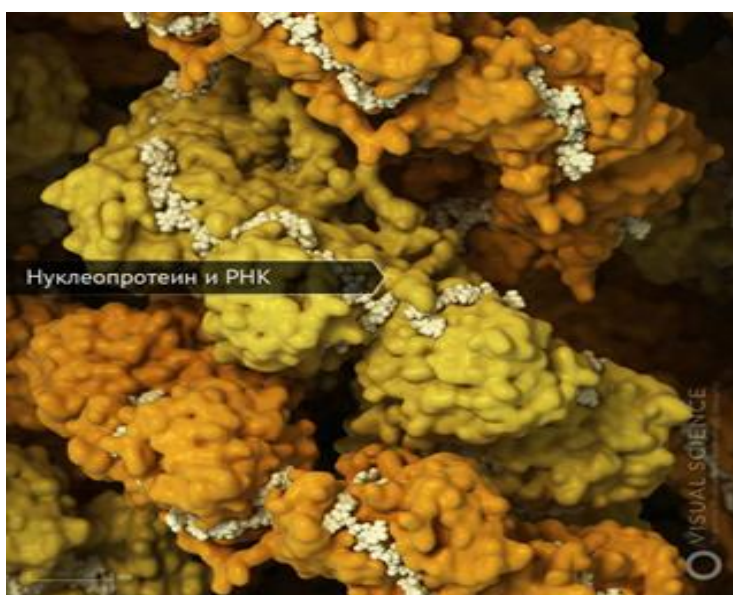


Рисунок 5 - Трехмерная модель комплекса нуклеопротеинов и РНК вируса гриппа [39].

В тесном контакте с NP и РНК находится РНК-зависимая РНК-полимераза, являющаяся полифункциональным комплексом, состоящим из пяти белков: PB1, PB1-F2, NP40, PB2 и PA.

Белки PB1, PB2, PA составляют так называемый полимеразный комплекс (рисунок 6), содержатся в вирионе в количестве 30-60 молекул каждого.

Белки PB1, PB2, PA взаимодействуют с двумя концами каждого фермента вирусной РНК. Кроме того, PB1 и PB2 взаимодействуют с NP.

Белок PB1 катализирует процессы полимеризации (элонгации) РНК-транскрипта, кРНК и ВРНК [50]. Белок PB2 узнает и связывается с 5-кЭП участком клеточной РНК. Этот фрагмент отщепляется эндонуклеазой и, претерпев конформационные изменения, участвует в праймировании транскрипции вирионных РНК [51]. Белок PA участвует в синтезе ВРНК [52] и индуцирует в ядре протеолиз коэкспрессируемых белков [53, 54].

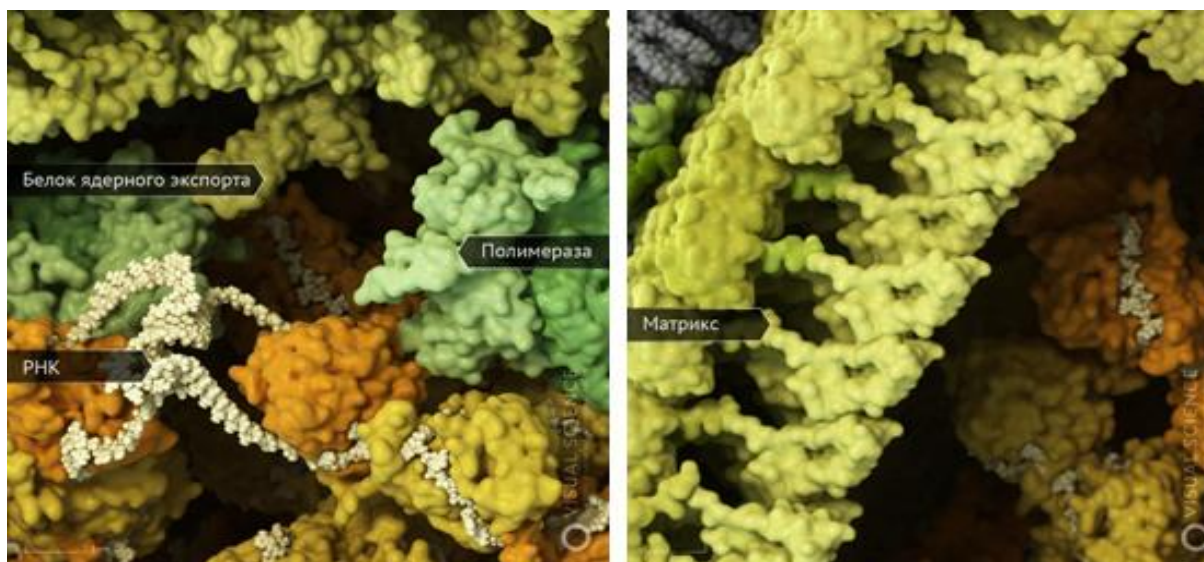


Рисунок 6 - Трехмерная модель внутренних белков вируса гриппа [39].

Неструктурные белки. Самый маленький восьмой сегмент генома вируса гриппа кодирует два белка, обнаруживаемых только в инфицированных клетках, - неструктурные белки NS1 и NS2.

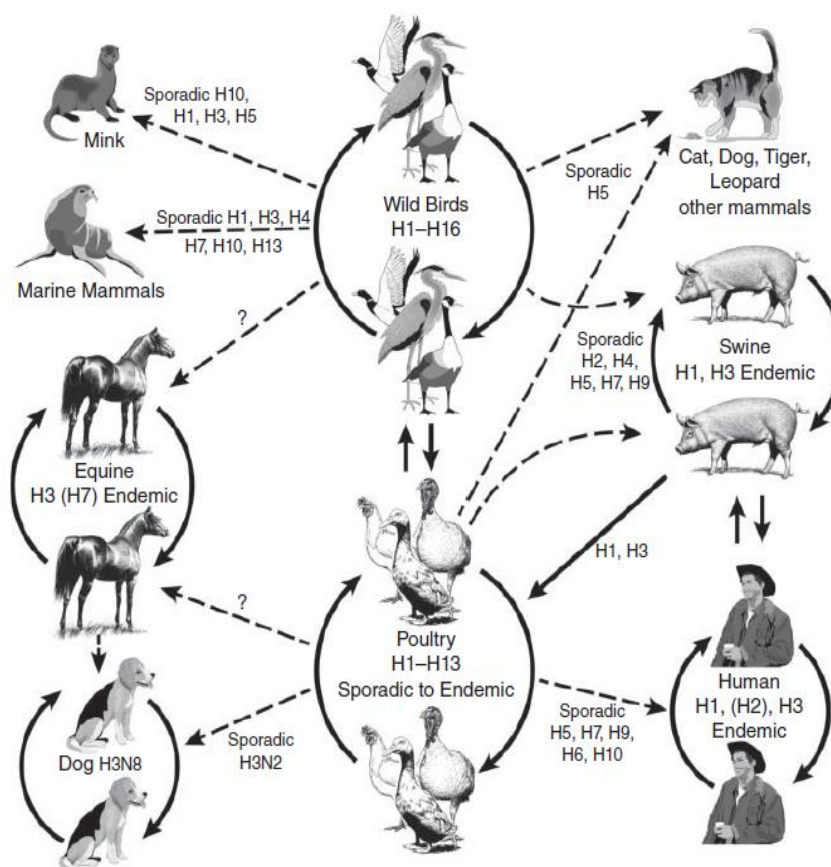
NS2-белок - небольшой белок, состоящий из 112 аминокислотных остатков. Основная функция - участие в транспорте РНП из ядра в цитоплазму, что необходимо для дальнейшей сборки вируса (за это его прозвали белком ядерного экспорта). NS2-белок взаимодействует с клеточным белком CRM1, который является клеточным фактором транспорта белков из ядра в цитоплазму. Помимо участия в транспорте РНП, NS2-белок выполняет регуляторную роль в процессе синтеза вирусоспецифических РНК, снижая уровень синтеза мини-репликонов vРНК, сРНК и мРНК.

NS1-белок - состоит из 230-237 аминокислотных остатков (в зависимости от штамма вируса) с молекулярной массой 26 тыс. Да. NS1 белок выполняет ряд регуляторных функций: ингибирование полиаденилирования хозяйских мРНК [55], ингибирование нуклеарного экспорта полиаденилированных хозяйских мРНК [56], ингибирование сплайсинга хозяйских мРНК [57] за исключением сплайсинга M2 мРНК [58], стимуляцию трансляции вирусных мРНК [59, 60] и модуляцию транскрипции и репликации вирусных РНК [61] селективный нуклеарный транспорт вирусных мРНК [62] и, возможно, является фактором вирулентности вируса гриппа [63].

Следует отметить, что многофункциональность свойственна не только NS1-белку. Структурные белки, такие как HA, NA, помимо своих основных функций, выполняют также дополнительные функции, обеспечивающие безопасность репродукции вируса. Например, NA обладает способностью стимулировать апоптоз; HA и NA проявляют фибринолитическую активность, способствующие снижению активности развития воспалительной реакции [64, 65].

1.3 Резервуары вируса гриппа А в природе

ВГ(А) являются важными патогенами для ветеринарии и здоровья человека во всем мире. Эта категория вирусов имеет разнообразный круг хозяев, включая большое количество видов птиц и млекопитающих. Экология и эпидемиология ВГ(А) очень сложны и объединяют множество свободноживущих и домашних птиц-хозяев, а также множество диких и домашних млекопитающих в окружающей среде, включая людей, свиней, лошадей, собак, летучих мышей и спорадические инфекции у различных хозяев-млекопитающих (рисунок 7).



Н - подтип гемагглютинина, в скобках указан подтип, ранее распространенный, но больше не циркулирующий.

Рисунок 7 – Схематическое изображение источника и перемещения вирусов гриппа А или их генов в эколого-эпидемиологической ситуации птиц и млекопитающих [66].

Еще одной ключевой характеристикой вируса является его генетическая и антигенная изменчивость, обусловленная сочетанием высокой скорости мутаций и сегментированного генома, обеспечивающего способность быстро изменяться и адаптироваться к новым хозяевам. При правильных условиях ВГ(А) может адаптироваться к новому хозяину таким образом, чтобы он мог эффективно воспроизводиться и передаваться, становясь эндемичным для

определенного вида. В общем, этот процесс адаптации приводит к появлению вирусной линии, имеющей определенный уровень специфичности к хозяину, что затрудняет заражение других видов. Например, вирус, который становится эндемичным для лошадей, становится менее способным заражать другие виды, такие как свиньи или люди.

1.4 Дрейф и шифт вариации вирусов гриппа

Можно выделить три механизма изменчивости ВГ – антигенный дрейф (посредством накопления мутаций), антигенный шифт (посредством реассортации) и рекомбинация. Антигенный дрейф происходит в результате точечных мутаций в геноме, что в свою очередь приводит к изменению антигенных детерминант белков до такой степени, что они перестают распознаваться иммунной системой хозяина. Именно мутации ответственны за возникновение новых антигенных вариантов.

Высокая скорость мутаций ВГ(А) и способность рекомбинировать генные сегменты обеспечивают разнообразие вирусной популяции [67, 68]. Оба метода дают вирусу возможность быстро изменяться и адаптироваться, что содействует способности вирусов заражать новые виды хозяев. ВГ(А) могут сильно различаться по аминокислотной последовательности, особенно по поверхностным гликопротеинам, НА и NA [69]. Эти различия в аминокислотной последовательности приводят к различиям в антигенности, поэтому антитела к ВГ(А) Н1 нейтрализуют только вирусы Н1, а не какой-либо другой подтип ВГ(А). Это имеет большое значение для вакцинации, так как вакцинная защита опосредована, прежде всего, специфическими антителами, вырабатываемыми к белку НА и, в меньшей степени, к белку NA [70].

Два подтипа ВГ(А) Н1Н1 и Н3Н2 являются эндемичными по всему миру среди людей. Для обоих подтипов вируса присутствует одна линия вируса, которую можно проследить до того времени, когда вирус был введен в человеческую популяцию [71-73]. В отличие от вирусов гриппа животных, эти два подтипа вируса эволюционировали с небольшой разницей в последовательности, основанной на географическом происхождении вируса. Это всемирное распространение, вероятно, является результатом широкого и быстрого перемещения людей между регионами, которые эффективно передают вирус и позволяют им одновременно циркулировать. Однако вирусы изменяются с высокой и предсказуемой скоростью, которую иногда называют молекулярными часами [71]. Наблюдаемые изменения в геноме не случайны, а сосредоточены преимущественно в поверхностных гликопротеинах [74].

Считается, что одним из первичных селективных факторов в отношении белка НА является давление антител со стороны хозяина либо в результате предыдущего воздействия вируса, либо в результате вакцинации [74]. Для человеческого белка ВГ(А) Н3 были охарактеризованы пять антигенных областей, в которых антитела к этим областям могут нейтрализовать вирус и, следовательно, будут защищать хозяина во время инфекции. Накопление аминокислотных замен в антигенных участках представляет собой антигенный дрейф, который приводит к тому, что вакцины против ВГ(А) со временем

становятся менее защитными. Что касается людей, посевные штаммы вакцины против гриппа, как ВГ(А), так и ВГ(В), оцениваются ежегодно, чтобы определить, эффективно ли циркулирующие в настоящее время полевые штаммы нейтрализуются антителами, продуцируемыми против вакцинного штамма. Сравнение вирусной последовательности используется для определения того, когда появляются новые вирусные варианты и с какой частотой [75]. Вакцинация против человеческого гриппа требует точного соответствия вакцины полевому штамму, иначе защита от вакцинации будет нарушена [76]. Антигенные различия более чем в четыре раза, по-видимому, представляют собой диапазон, в котором снижение специфичности антител влияет на защиту от вакцин. Посевные штаммы обычно меняют каждые 3–4 г., чтобы компенсировать этот антигенный дрейф [75].

Для домашней птицы также имеет место антигенный дрейф, но интерпретация и значение его гораздо сложнее. Проблема, связанная с ВГП, связана с большим разнообразием вирусов, которые могут инфицировать домашнюю птицу. Поскольку большинство вспышек низкопатогенных и высокопатогенных ВГП являются результатом независимой интродукции вирусов из различных резервуаров диких птиц, большинство эпидемиологически не связанных вспышек антигенно отличаются друг от друга даже в пределах одного и того же подтипа [77, 78]. Это антигенное разнообразие, обычно подразделяется на североамериканские и евразийские линии, и при выборе штамма вакцинного посевного материала следует, как минимум, учитывать как можно более точное соответствие аминокислотной последовательности НА, чтобы попытаться получить наилучшую защиту [79]. Однако на выбор штамма вакцинного посевного материала влияет множество различных факторов.

Для человека и млекопитающих животных дополнительной проблемой при гриппозной инфекции является антигенный шифт. Антигенный шифт происходит, когда большая часть популяции хозяина ранее контактировала с определенным подтипом НА в результате инфекции или вакцинации, а затем подвергалась воздействию другого подтипа НА [80]. Поскольку у принимающей популяции защитный иммунитет к новому вирусу слабый или отсутствует вообще, он может быстро распространяться в новой популяции, вызывая широкомасштабную, а иногда и серьезную вспышку гриппа, называемую пандемией. В человеческой популяции за последнее столетие произошли четыре крупные пандемии. Наиболее серьезным был случай, когда в 1918 г. появился вирус А/Н1N1, вероятно, заменивший человеческий грипп А/Н2, что привело к крупной пандемии, унесшей жизни около 50 миллионов человек [81]. Вторая пандемия века произошла в 1957 г., когда вирус А/Н1N1 был вытеснен вирусом А/Н2N2. Третья пандемия началась в 1968 г., когда вирус А/Н3N2 вытеснил вирус А/Н2N2 [82]. Самой последней пандемией был грипп А/Н1N1pdm, возникший в 2009 г. Этот вирус, хотя и относится к тому же подтипу, что и циркулирующий сезонный вирус А/Н1N1, но тем не менее отличался достаточно, чтобы быстро распространяться среди людей, и в конечном итоге вытеснил старый вирус А/Н1N1 из циркуляции среди людей

[83]. Происхождение новых пандемических вирусов, как правило, до конца не изучено, тем не менее представляется, что они могут быть вызваны введением в человеческую популяцию совершенно нового ВГ(А) или рекомбинацией между циркулирующим штаммом человека и другим ВГ(А) животных [82]. Вирус А/Н1N1 1918 г. оказался совершенно новым вирусом, но вирусы А/Н2N2 и А/Н3N2 были реассортантными вирусами, которые изменили несколько генов, включая, что наиболее важно, ген НА. Вирус А/Н1N1pdm 2009 г. был тесно связан с ВГС, циркулирующим в Северной Америке, но событие реассортации с неизвестным вирусом привело к появлению двух других генов, которые позволили вирусу реплицироваться и хорошо передаваться людям [87].

Таким образом, характерной особенностью вирусов гриппа А является их большая изменчивость, обусловленная тремя механизмами (антигенный дрейф, антигенный шифт и рекомбинация). Наиболее значимым механизмом изменчивости вируса гриппа является рекомбинация или замена одного или нескольких генных сегментов. Эти изменения достигаются за счет сегментированного генома вируса и двойного или множественного заражения хозяина штаммами вируса разных подтипов или генетических линий. В результате реализации данного механизма значительно увеличивается скорость эволюции ВГ(А). События реассортации, ведущие к обмену генами НА и НА, имеют особое значение, поскольку они могут привести к антигенному шифту. В истории вируса гриппа реассортация привела как минимум к трем антигенным изменениям и появлению штаммов, вызвавших пандемии 1957, 1968 и 2009 гг.

1.5 Роль свиней в качестве резервуара вирусов гриппа

Свиной грипп является серьезным респираторным заболеванием свиней. Обычно грипп у свиней характеризуется высокой заболеваемостью (приближающейся к 100%) и в целом низкой смертностью (<1%). Вирус свиного гриппа у свиней вызывает клиническое заболевание, подобное гриппу у людей. В частности, инфекции, вызванные вирусом свиного гриппа, проявляются в виде острого респираторного заболевания, характеризующегося лихорадкой, малоподвижностью, снижением потребления пищи, респираторного дистресса, кашля, чихания, конъюнктивита и выделений из носа [84-86]. Свиной грипп был впервые признан болезнью свиней во время пандемии «испанского гриппа» осенью 1918 г., когда Д.С. Коэн, работавший в Бюро животноводства США в Форт-Додже, штат Айова инспектором по холере свиней, наблюдал поразительное сходство клинической картины у больных людей и свиней [87]. Этиологический агент заболевания ВГ впервые изолирован Ричардом Е. Шоупом в 1931 г. [87, 88]. С тех пор свиной грипп играет важную роль в свиноводстве во всем мире [89].

После изоляции Е. Шоупом первого вируса свиного гриппа прошло более 50 лет, прежде, чем в 1983 г. от свиньи в Китае был выделен вирус гриппа типа С [90-93]. Циркуляция штаммов ВГ(В) Victoria/В и Yamagata/В у свиней сначала была подтверждена в серологических исследованиях в Соединенных Штатах в 2010-2012 гг. Кроме того, в этих исследованиях вирус гриппа типа В

был обнаружен в РТ-ПЦР и при секвенировании трех мазков из носа свиней [94, 95]. В 2014 г. от естественно инфицированных свиней были выделены и идентифицированы три штамма Викторианской линии вируса гриппа типа В [4]. Вирусы гриппа типов В и С вызывают легкие респираторные заболевания у свиней [4, 91-93, 96]. Штамм вируса гриппа нового типа D обнаружен у свиней в 2011 г. в Оклахоме в США [97, 98], также он был обнаружен в популяции свиней в Китае [99], Италии [100], Люксембурге [101] и Франции [102]. Интересно, что в отличие от людей, у которых сезонность влияет на возникновение и прогрессирование заболевания гриппом, вирусы гриппа у свиней могут быть обнаружены в течение всего года [103, 104].

Известно, что ВГ(А) имеют широкий круг хозяев [105]. Основным резервуаром служат водные и околотовные птицы (гуси, утки, кулики и чайки), а также многие другие виды птиц [106]. Комбинация циркулирующих 16 подтипов НА и девяти подтипов NA позволяет сформировать 144 сочетания НА/NA, из которых у птиц уже выделено более 110 субтипов. Неизвестно, существуют ли в природе все теоретические комбинации НА/NA. К важным видам млекопитающих-хозяев относятся: люди, свиньи и лошади. Другие млекопитающие выступают как случайные хозяева без установления устойчивых цепей заражения.

Не смотря на то, что свиньи не считаются основным естественным резервуаром ВГ(А), как носители динамичного набора вирусов, они играют центральную роль в экологии гриппа [105]. В популяциях свиней были выделены подтипы ВГ(А) человеческого и птичьего происхождения, включая H1, H2, H3, H4, H5, H7 и H9 [107]. Однако число таких выделений ограничено.

В Европе свиной грипп вызывается тремя подтипами вируса, которые генетически отличаются от Csw H1N1. Птичий вирус свиного H1N1 обычно вызывает менее тяжелые симптомы, чем human-like свиные вирусы H3N2, поэтому естественные инфекции H1N1 иногда не распознаются.

Имеются данные о том, что вирусы гриппа несколько раз заносились европейским свиньям. Однако устойчивые инфекционные цепи были впервые установлены в 1970-х гг. До этого вирусы сезонного и Csw выявлялись в ходе серологических исследований и отдельных выделений вируса. Различают зоонозные вирусы человеческого и птичьего происхождения, выделенные от свиней, с одной стороны, и «human-like» и «avian-like» вирусы, с другой стороны. В то время как первые вирусы встречаются время от времени и вымирают после нескольких циклов репликации, вторые вирусы имеют определенные генетические настройки, образующие отдельные клады на филогенетических деревьях, которые указывают на стабильные события заражений для многих поколений вирусов. Также, эти вирусы показывают генетические изменения. Термины «human-like» и «avian-like» используют в основном для обозначения предыдущего хозяина [108, 109].

Наибольшее распространение среди свиней получили штаммы вируса гриппа А подтипов H1N1, H3N2 и H1N2. Они являются энзоотическими у свиней во всем мире, но их происхождение, а также их генетические и антигенные характеристики различаются между континентами и

географическими регионами [110]. Внутри каждого из этих подтипов обнаруживаются многочисленные антигенные и реассортантные варианты.

Рекомбинация часто происходит не только среди ВГ(А) свиней, но и среди ВГ(А) из других источников, особенно человеческого и иногда птичьего происхождений. Сохранение этих вирусов в популяции свиней сопровождается дальнейшей рекомбинацией, антигенным сдвигом и/или дрейфом. Внедрение нового ВГ(А) в популяцию свиней обычно вызывает эпидемию, за которой следуют эндемичные и/или субклинические инфекции, которые могут сохраняться в течение длительного периода времени [111].

Одной из основных детерминант круга хозяина являются молекулы рецептора на поверхности клетки-хозяина. Вирус гриппа А связывается с сиаловой кислотой (N-ацетилнейраминовая кислота), соединенной а-гликозидной связью с концевыми остатками галактозы углеводных цепей гликопротеинов и гликолипидов [112]. Как видовая, так и тканеспецифическая экспрессия молекул рецепторов определяют круг хозяев и тропизм вирусов гриппа А [113, 114]. В то время как вирусы птичьего гриппа связываются с а-2,3-связанной сиаловой кислотой, штаммы вируса сезонного гриппа человека распознают а-2,6-связанную сиаловую кислоту. Эпителий верхних дыхательных путей свиней экспрессирует оба типа рецепторов и поэтому свиньи могут быть восприимчивы к вирусам гриппа, адаптированным как к птицам, так и к людям и могут выступать промежуточными хозяевами [113].

На экологию ВГ сильно влияет адаптация вируса к хозяину. Согласно классической теории, свиньи могут играть значительную роль в адаптации ВГ животных к человеку. Эта гипотеза была впервые поддержана Scholtissek и его коллегами в 1985 г. На основании своих исследований по изучению сохранения чувствительных к температуре (t_s) мутантов NP гена птичьего вируса H7N1 путем коинфицирования фибробластов куриных эмбрионов, было сделано предположение о том, что NP ВСГ могут иметь более широкий круг хозяев в сравнении с человеческими или птичьими вирусами и что свиньи являются «смешивающим сосудом» для генерации реассортантных вирусов [115]. Гипотеза «смешивающего сосуда» была подтверждена двумя выводами. Во-первых, сходство подтипов между циркулирующими вирусами гриппа А человека и вирусами гриппа свиней. Во-вторых, возможность одновременного инфицирования свиньи вирусами птичьего, человеческого и свиного гриппа, что приводит к образованию и выделению реассортантов [116]. На молекулярном уровне в 1998 г. Ito и его коллеги подтвердили данную гипотезу, продемонстрировав присутствие основных рецепторов сиаловой кислоты для вирусов птичьего и человеческого гриппа (Sia α 2,3Gal и Sia α 2,6Gal соответственно) в трахее свиней. Кроме того, они продемонстрировали, что некоторые «птичьи» вирусы свиного гриппа приобрели молекулярные черты адаптации человека путем непрерывной репликации в эксплантатах трахеи свиней [113]. В результате было сделано предположение, что свиньи могут также выступать в качестве промежуточного хозяина, в котором вирусы птичьего гриппа способны приобретать черты адаптации к млекопитающим. Однако для достижения эндемичных параметров репликации и

трансмиссивности ВГ(А) -S, вероятно, потребуется дополнительная адаптация [117].

Сегодня конкретная роль свиньи и точные механизмы межвидовой передачи остаются неизвестными. Недавние исследования показали, что передача вируса от человека к свиньям является ключом к пониманию эволюции разнообразия гриппа у свиней, при этом накопилось значительно больше информации о передаче вируса от человека свиньям, чем от свиней человеку [118].

Появление в 2009 г. вируса H1N1pdm09 у свиней вызвало опасения, что свиньи являются источником пандемий, и стимулировало дополнительные исследования [119-121]. Некоторые ученые предположили, что предыдущие пандемические вирусы двадцатого века также могли быть генерированы путем рекомбинации в организме млекопитающего-хозяина, возможно, в свинье [122, 123]. Затем была предложена дополнительная роль свиней в генерации вирусов пандемического гриппа.

Впервые обнаруженный у свиней на Среднем Западе США в 1918 г. классический свиной грипп оставался важным для свиноводческой отрасли во всем мире. Однако с 1998 г. в результате серии событий эпидемиология свиного гриппа резко изменилась и в популяции свиней США утвердился ряд новых подтипов и генотипов. Появился новый ВГС, который имел уникальную внутреннюю генетическую комбинацию, состоящую из генов свиного, человеческого и птичьего ВГ(А), а также генов H3 и N2 human-like вирусов [124, 125]. Данная генетическая комбинация получила название кассета внутренних генов тройной реассортации, которая способна принимать различные сочетания HA и NA, такие как H1N1, H1N2, H3N1 и H3N2 [126]. В результате с 1999 г. в Северной Америке множественные антигенные варианты и множественные события реассортации с человеческими вирусами создали постоянно меняющуюся коллекцию ВГС [127]. В основу человеческого пандемического вируса H1N1 2009 г. также были включены несколько генов из кассеты внутренних генов тройной реассортации [83].

Из чего можно заключить, что в силу особенностей строения эпителия верхних дыхательных путей свиней, экспрессирующих рецепторы сиаловой кислоты α-2,3- и α-2,6-типов, они способны инфицироваться как птичьими, так и человеческими ВГ. И поэтому свиньи могут играть значительную роль в адаптации ВГ животных к человеку и выступать в качестве промежуточного резервуара для генерации вирусов пандемического гриппа.

1.6 Взаимосвязь гриппа свиней и человека

ВГ(А) является наиболее распространенными, способными инфицировать различные виды животных и единственными вирусами обладающими пандемическим потенциалом (таблица 1) [128-130]. ВГ широко распространены в природе и поражают как людей, так и ряд млекопитающих, включая свиней, лошадей, тюленей и китов, а также птиц различных отрядов [105, 131]. Благодаря уникальной физиологии и большого сходства между гриппом свиней и человека, свиньи считаются «плавильным котлом», в которых вирусы

«птичьего» гриппа адаптируются к млекопитающим, включая человека [131]. Диапазон хозяина ВГ(А) и ВГ(В) определяется их специфичностью к рецепторам сиаловой кислоты. Белки НА ВГ(А) могут связываться с рецепторами сиаловой кислоты α -2,3 и α -2,6, присутствующими в эпителии респираторного тракта птиц и человека, соответственно [112, 132, 133]. Как было указано выше, в эпителии респираторного тракта свиней присутствуют рецепторы сиаловой кислоты, и α -2,3, и α -2,6, благодаря чему свиньи могут инфицироваться как ВГ птиц так и человека, увеличивая вероятность одновременного заражения и репликации разных подтипов вирусов, а также генетической реассортации [112, 134]. При возникновении нового вируса способного инфицировать людей, обладающего стойкой способностью передаваться от человека человеку и высокой вирулентностью, может возникнуть пандемия, поскольку у людей вряд ли будет заметный иммунитет к новому штамму. Все пандемии последних ста лет возникли в результате появления нового штамма гриппа, против которого у людей практически отсутствовал иммунитет: испанский грипп H1N1 (1918), азиатский грипп H2N2 (1957), гонконгский грипп H3N2 (1968) и свиной грипп H1N1 (2009). Краткое описание пандемий представлено в таблице 3 [135].

Таблица 3 - Краткое описание основных характеристик пандемий за последние сто лет

Название пандемии	Год	Штамм	Предполагаемое происхождение вспышки	Приблизительное количество смертей
Испанский грипп	1918 - 1920	H1N1	Китай	40 - 50 млн
Азиатский грипп	1957 - 1958	H2N2	Китай	1 - 2 млн
Гонконгский грипп	1968 – 1970	H3N2	Китай	500 000 – 2 млн
Свиной грипп	2009 - 2010	H1N1	Мексика	свыше 575 000

Первая пандемия объявленная в 1918 г. Испанией в дальнейшем получила название «испанки» [87, 136]. По оценкам, треть населения мира (или ≈ 500 миллионов человек) были инфицированы и имели клинически выраженные заболевания [137] во время пандемии гриппа 1918–1919 гг. Пандемия протекала волнами и преимущественно унесла жизни молодых людей. Показатели летальности составили $> 2,5\%$ по сравнению с $< 0,1\%$ для других пандемий гриппа [138, 139]. Общая смертность оценивалась в ≈ 50 миллионов и, вероятно, достигла 100 миллионов. Пандемия гриппа 1918 г. возникла в результате реассортации циркулирующего до этого человеческого вируса H1, получившего гены N1 и гены внутренних белков от птиц [140-143]. Одной из особенностей пандемии гриппа 1918 г. являлась одновременная (или почти одновременная) инфекция людей и свиней. По видимому вирус 1918 г.

экспрессировал антигенно новый подтип, к которому у большинства людей и свиней в 1918 г. не было иммунитета [144].

Вторая пандемия гриппа произошла в 1957 г. (в Азии) и была связана с вирусом H2N2, который унес жизни около двух миллионов человек, самая высокая смертность наблюдалась среди больных старше 65 лет. [135]. Третья пандемия гриппа («гонконгский» грипп) в 1968 г. охватила население вспышкой заболевания, вызванной вирусами типа H3N2, подобными штамму А/Гонконг/1/68 и привела к гибели примерно двух миллионов человек [122, 135]. Пандемии 1957 г. и 1968 г. были вызваны новыми вирусами, появившимися в результате реассортации. Геномы трех последних пандемических ВГ (1918 H1N1, 1957 H2N2 и 1968 H3N2) произошли полностью или частично из животных резервуаров, а гены НА всех пандемических вирусов в конечном итоге - от вирусов птичьего гриппа. Установлено, что вирусы гриппа А(H1N1), впервые выделенные от свиней в 1930 г., антигенно схожи с реконструированным человеческим вирусом А(H1N1) 1918 г. [145] и, вероятно, имеют общего предка [146, 147]. С 1930 г. до конца 1990-х гг. эти вирусы «классического свиного гриппа» циркулировали среди свиней и оставались относительно антигенно стабильными [148, 149].

В 2009 г. человечество столкнулось с последней пандемией гриппа (свиной), вызванной принципиально новым вариантом ВГ А подтипа H1N1, впервые обнаруженного у свиней в Мексике в марте-мае 2009 г. [119], и лишивший жизни около 575 000 человек по всему миру [135]. «Свиной грипп» произошел от пандемического реассортантного варианта H1N1, получившего в поледствии название «А(H1N1) pdm09» [119]. В начале пандемии гриппа 2009 г. полногеномное секвенирование «А (H1N1) pdm09» показало, что это был новый реассортантный вирус, состоящий из сегментов трех основных линий swВГ(А) [121]: Сегменты генов НА, NP и NS относятся к Csw, попавших к свиньям примерно в 1918 г. и впоследствии циркулировавших у них в виде Csw и TRsw; сегменты генов NA и М относятся к евразийской генетической линии ВГС, полностью произошедшие от птичьего ВГ и, как считается, проникли в евразийскую популяцию свиней в 1979 г.; сегменты генов PB2 и PA относятся к TRsw линии ВГС; и наконец, сегмент гена PB1 находится в линии TRsw ВГС, в свою очередь заимствованный от вируса гриппа человека 1968 г. (H3N2).

Азия является глобальным источником новых вирусов сезонного гриппа человека [150, 151], вирусов птичьего гриппа, связанных с пандемиями 1957 г. и 1968 г. [152], и новых вирусов птичьего гриппа с пандемическим потенциалом [153, 154]. С 2009 г. в нескольких исследованиях указывалось на то, что азиатские свиньи являются возможным источником реассортантного вируса свиней TRsw/Csw/EAsw, который являлся предшественником А(H1N1)pdm09. Известно, что Азия - единственный регион, где TRsw, Csw и EAsw, обмениваются сегментами посредством реассортировки [155-157]. В начале пандемии ВГ(А), идентифицированные у свиней в Гонконге (swВГ(А)), были более тесно связаны с А(H1N1)pdm09, чем с любыми другими swВГ(А), доступными в мире.

В то время как популяция свиней может выступать в качестве резервуара для вирусов человеческого происхождения, циркулирующих с более низкой скоростью дрейфа, человеческая популяция, вероятно, вырабатывает защитный иммунитет только против недавних сезонных штаммов с более высокой скоростью дрейфа. Таким образом, человеческая популяция защищена от недавних сезонных штаммов, но остается наивной против старых штаммов, циркулирующих только у свиней [158, 159]. Серологическое исследование показало, что инфекционный иммунитет к новым вирусам человека H3N2 обеспечивает минимальную перекрестную защиту от европейских вирусов H3N2 человеческого происхождения, циркулирующих у свиней [160].

Вследствии этого, не смотря на то, что только подтипы H1N1, H1N2 и H3N2 являются эндемичными для свиней во всем мире, обнаруживается огромное разнообразие как в генах HA и NA, так и в остальных шести генах. В целом все пандемии последних ста лет возникли так или иначе из животных резервуаров в результате появления нового штамма ВГ(А), против которого у людей практически отсутствовал иммунитет. ВГ(А) человека и свиней тесно взаимосвязаны между собой и благодаря межвидовой передаче приводят к регулярной трансмиссии от человека к свинье и обратно. Такая взаимосвязь ВГ(А) человека и свиней является причиной появления пандемического реассортантного варианта A(H1N1) pdm09.

1.7 Реассортантный вирус A(H1N1)pdm09 XXI столетия

Несмотря на то, что во всем мире в популяции свиней эндемичны только три подтипа ВГ(А) H1N1, H1N2 и H3N2, гены HA и NA демонстрируют огромное разнообразие. Большая часть наблюдаемого разнообразия ВГ(А) является результатом двусторонней передачи между свиньями и людьми. Эти сложные эволюционные процессы были отмечены появлением тройных реассортантных вирусов H3N2 с последующим сохранением кассеты внутренних генов тройной реассортации. Эта динамика способствовала возникновению многочисленных генетических и антигенно различных линий, социркулирующих у свиней по всему миру. В дальнейшем исход этих эволюционных событий был четко продемонстрирован в 2009 г. пандемией свиного происхождения [161].

11 июня 2009 г. Всемирная организация здравоохранения объявила первую пандемию 21 века, вызванную вирусом A(H1N1)pdm09. Данная эпидемия гриппа была выявлена в апреле 2009 г. на границе США и Мексики. Возбудитель, ответственный за эту пандемию, вирус свиного гриппа A A(H1N1)pdm09 характеризуется уникальной комбинацией генных сегментов различного происхождения, которая ранее не была идентифицирована среди вирусов человеческого или свиного гриппа А. Филогенетический анализ вируса A(H1N1)pdm09 показал, что предки 8 сегментов различны и имеют птичье, человеческое и свиное происхождение [120]. В предыдущих пандемических вирусах подтип H1 сменился на H2 в 1957 г. и с H2 на H3 в 1968 г., тогда как пандемический вирус 2009 г. имел H1 североамериканских свиней и N1 евразийских свиней, заменив циркулирующий подтип сезонного вируса H1N1

человека [162]. Филогенетический анализ всех доступных последовательностей вируса H1N1 в GenBank показал, что штаммы вируса A(H1N1)pdm09, штаммы свиней из Нью-Джерси 1976 г. и штаммы пандемического H1N1 1918 г. отличаются от штаммов сезонных ВГ человека H1N1, циркулировавших с 1918 г. (рисунок 8).

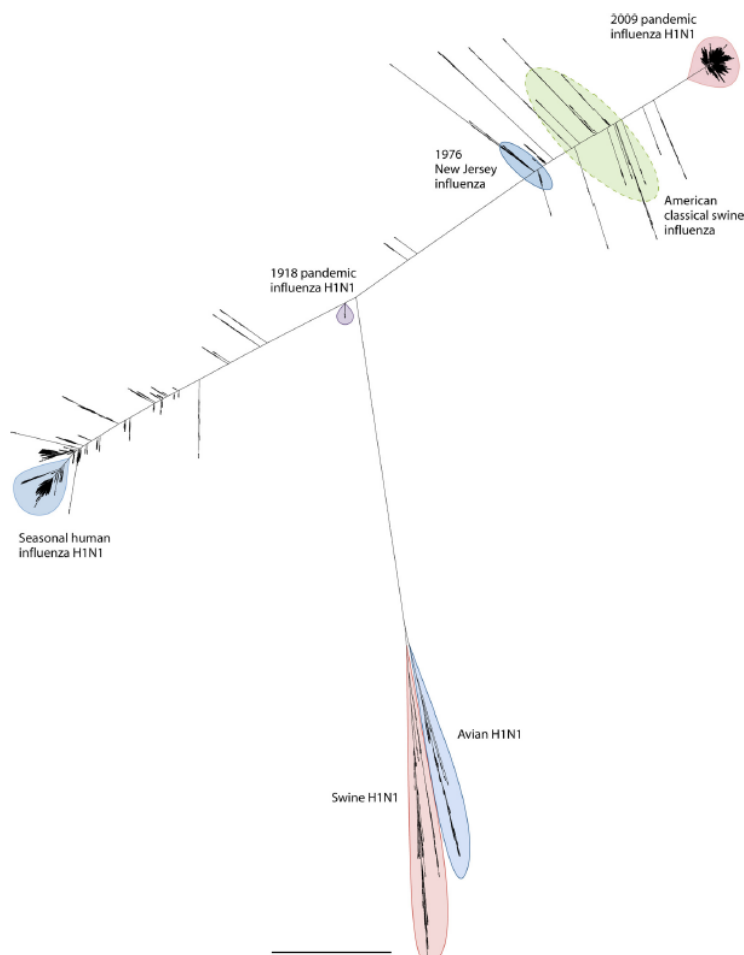


Рисунок 8 - Филогенетическое дерево максимального правдоподобия из 3764 полноразмерных нуклеотидных последовательностей гемагглютинина штаммов A(H1N1)pdm09 из ресурса вирусов гриппа NCBI.

Филогенетическую реконструкцию проводили с использованием RAxML версии 7.2.6. Выделены позиции штаммов пандемического гриппа 1918 г., свиного гриппа Нью-Джерси 1976 г., сезонного и пандемического гриппа человека А 2009 г.

Как указывают многие исследования, важную роль в вирулентности ВГ(А) играет гликозилирование, подчеркивая его значимость для функции НА. Участки гликозилирования НА специфичны для клетки-хозяина и влияют на сборку, транспорт, протеолитическое расщепление, связывание с рецептором и активность слияния НА и, таким образом, на инфекционность вируса. [163-165]. Кроме того, было обнаружено, что углеводные боковые цепи, присоединенные к НА, влияют на антигенные свойства и модулируют распознавание НА с помощью CD4 + Т-клеток [166]. Гликозилирование у

вируса A(H1N1)pdm09 было связано с маскировкой эпитопов на молекуле НА, которое значительно уменьшило гликозилирование в сравнении с предыдущим вирусом сезонного гриппа H1N1 [167]. Это открытие может частично объяснить, почему однократной дозы вакцины против гриппа A(H1N1)pdm09 было достаточно, чтобы вызвать иммунитет у иммунологически наивных людей.

Вирус пандемического гриппа ведет себя так же, как и другие вирусы гриппа, сохраняет инфекционность более 24 часов при низкой (<25%) и высокой (>80%) относительной влажности, но менее стабилен при промежуточной влажности (50%) и более высоких температурах [168, 169]. Таким образом, вирус должен быть наиболее устойчивым при низких температурах зимой. Вирус A(H1N1)pdm09 появившийся весной 2009 г. в Северной Америке и в дальнейшем распространившийся по всему миру, с тех пор циркулирует у людей и иногда передается от людей свиньям, что приводит к вирусной адаптации в популяциях свиней [170]. О передаче вируса A(H1N1)pdm09 от людей свиньям сообщалось во многих странах. В Канаде инфекция A(H1N1)pdm09 была зарегистрирована на свиноферме в апреле 2009 г., и впоследствии также выявлена передача инфекции от свиньи к свинье [171, 172]. В Австралии в течение 2009 г. у свиней было зарегистрировано по меньшей мере три вспышки A(H1N1)pdm09 [173]. Также есть сообщения об инфицировании свиней A(H1N1)pdm09 в 2009 г. в Юго-Восточной Азии, в том числе в Таиланде и Вьетнаме [174, 175]. По меньшей мере 25 стран сообщили о возникновении инфекции A(H1N1)pdm09 у свиней в МЭБ [176].

Накопленные в настоящее время научные данные о циркуляции ВГС имеют большое значение для понимания эпидемиологии и эволюции ВГ [177]. После пандемии 2009 г. генетический контроль циркуляции ВГС показал совместную циркуляцию различных подтипов ВГ(А). Так, активное наблюдение, проведенное в США у свиней от четырех до 24-недельного возраста и старше выявило одновременное заражение вирусами гриппа H3N2 и H1N1pdm09. В Китае 24% обследованных свиней дали положительный результат на сочетанную инфекцию на вирусы H1 и H3. Полногеномный филогенетический анализ ВГ(А) в США в 2009-2016 гг., продемонстрировал наличие 44 различных генотипов H3N2, причем большинство этих генотипов содержат по крайней мере один сегмент гена пандемического вируса 2009 г. Сосуществование различных штаммов ВГС у отдельных особей способствует реассортации генов и появлению новых штаммов с зоонозным потенциалом. [178].

Многолетние наблюдения выявили появление новых реассортантов H1N1. Так в Германии в 2013 г. выявлен ВГС подобный свиным H1N1, с гемагглютинином полученным от человеческого вируса гриппа и птичьей нейраминидазой и внутренними генами [179]. Известны случаи заражения всеми типами ВГ, зарегистрированными в популяциях свиней во всем мире. Многочисленные сообщения об инфицировании свиней вирусами птичьего гриппа, зафиксированные в последние два десятилетия в Китае, США, Канаде, Южной Корее, Нигерии и Египте, предоставляют доказательства межвидовой

передачи ВГ от птиц свиньям. Генетическое разнообразие ВГС расширяет межвидовая передача ВГ H3N8 от лошади к свинье в Китае. Появление двойных и тройных реассортантных ВГ, возникших у свиней в результате рекомбинации птичьих, человеческих и свиных штаммов, еще больше увеличили генетическое разнообразие ВГС. Глобальная тревога и значительная угроза общественному здоровью связанная с последней пандемией COVID-19, еще раз подтверждает необходимость активного эпиднадзора за зоонозными вирусными заболеваниями с пандемическим потенциалом [177].

В связи с реальной угрозой появления новых ВГ от свиней для предотвращения будущих пандемий гриппа необходимо проводить активный надзор за циркуляцией ВГС, включающий их генетическую характеристику, необходимую как для контроля эволюции вирусов в поголовье свиней и разработки чувствительных и специфических диагностических тестов, так и для выбора вакцинного штамма. В свою очередь эффективность вакцин должна оцениваться в контексте серологической перекрестной реактивности при появлении новых вариантов. Кроме того решающее значение для эпиднадзора за гриппом имеет успешная изоляция вируса, необходимая для определения его типовой и подтиповой принадлежности и дальнейшей характеристики.

Для получения полной картины отличий наиболее известных вирусов между собой и с вирусом A/H1N1/2009pdm приведена таблица аминокислотных последовательностей гемагглютинина и нейраминидазы в сравнении с вирусом гриппа 1918г. и птичьим вирусом гриппа A/H5N1, содержащие сайты патогенности.

Аминокислотная последовательность НА различных субтипов вирусов гриппа характеризуется невысокой степенью гомологии, лишь около 35% аминокислот в структуре НА у них сходны. Несмотря на то, что вирусы разных типов и субтипов отличаются невысокой степенью гомологии аминокислотных последовательностей, в молекулах НА существует общность архитектурных конструкций, основных функциональных областей и консервативных участков.

Большинство аминокислотных замен, влияющих на антигенные свойства вирусов и приводящих к возникновению новых эпидемически актуальных вариантов вирусов гриппа, локализованы в ограниченных районах поверхности НА — антигенных сайтах.

Для молекулы НА вируса гриппа были определены пять основных антигенных сайтов, изменения в которых коррелируют с изменениями антигенных свойств — А, В, С, D, Е. Гомология последовательности НА вирусов гриппа А подтипа H1N1pdm, выделенных в 2009 г., в сравнении с штаммом A/Brisbane/59/2007 (H1N1), используемым до 2009 г. в качестве вакцинного, составила 79%. НА вируса гриппа A/California/07/2009 содержит 103 аминокислотных замены, при этом более 30 из них находятся в антигенных сайтах, а более 20 являются существенными, и связаны с изменением заряда или полярности.

```

H1N1-1918 001 MERNLLVLLCAFATNADPTICIGYHANKSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLDSHNGKLCCKLKGIAFLQLGKCNIAGULLGNPECDLLLTASSUSYIVETS 100
H1N1-2009 001 .K.I.V.M.YT..TA....L.....K.....R.V...H.....I.....E.S.S..... 100
H5N1Anhui 001 ..KIVL..AIVSLVKS.Q.....EQ...IH.....AQDI..KT.....D.D.VK..I..FD.SV.....H..EFINVPE.....KA 099

H1N1-1918 101 NSNGTCYFGDFIDYEE LREQLSSVSSFEKFEI FPKTSSUPNHETTKGVTAACSYAGASSFYRNL LULTEKGS SVPKLSKSYVNNKGSEVLVLUGVHNP 200
H1N1-2009 101 S.D.....R.....DSN.....PH...K...K...I..V...N....L...I.D.....I...S 200
H5N1Anhui 100 .PA.DL...N.N....KHL..RIMH...IQ.I...SD..ASS..SS..P.Q.TP..F..VV..I..MNT..TIKR..N.TMQEDL.I...I..SN 198

H1N1-1918 201 TGTDOOSLYQADAYYSVGSSKYNRRFTPEIAARPKVRDQAGRNHYTWTLLPEGDTITFEATGHLIAPUYAFALNRCSSGSGIITSDAPVHDCNTHCOTPH 300
H1N1-2009 201 .SA.....F....R.SKK.K...I.....E.....V...K.....VV.R...NE.NA.....T.....K 300
H5N1Anhui 199 DAAE.TK.....FTT.I...T.TL.Q.LV.K..T.S..NG.S...DFF..I.K.N.AIN..SM..F...E..YKIVKGD.A.VK.EVEYOM.....I 298

H1N1-1918 301 GAINSSLFPQNHMPVTIGECPKYVRSTKLRHATGLRNIP---SIQSRLGFGAIAGFIEGGFTGHIDGMYGYHMQNEQSSGYAADQKSTQNAIDGITMKVNSVI 4
H1N1-2009 301 ....T.....I...K...K...L.....V.....L.....E..... 4
H5N1Anhui 299 .....H..H....L.....K.N..VL.....S.LRESRK.....Q..V.....S.....KE...K...V.....I.. 4

H1N1-1918 401 EKQNTQFTAVGKEFNHLEPRRIENLNEKVDGFLDINTYNAELVLLENERTLD FDSNVNHLVEKVKESQLKQNAKEIGMCGCFEYHMKDDACHESYRNGT 500
H1N1-2009 401 .....H..K.....Y...K.....NT...K... 500
H5N1Anhui 402 D.....E..R.....NE...V.....H.....K...D..RL..FD...L.....NE..... 501

H1N1-1918 501 YDYPKYSEESKLNFREEDGVKLESHGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFVMCSNGSLQCRICI 569
H1N1-2009 501 .....A.....TRI.....V..... 569
H5N1Anhui 502 ...Q...AR.K...S.....I.T...S.....A.AINVAGL.L..... 570

H1N1-1918 001 HNNPQKIITIGSICNVGGLISLILQIGNIIISIVSHSIQTGNQHPFETCHOSIITYENNTVNMOTVYVNIHNTNVVAGQDATSVILTONSSLCPISGVAIY 100
H1N1-2009 001 .....V..YI..MNN.....I.....L...QI...V.....FA...SVV..K.A.....V..... 100
H5N1Anhui 001 .....I..V..N....N.....HOA.P.....R.A.FLTENAVA..T.A.....VR...VH 080

H1N1-1918 101 SKDNGIRIGSGGDVFFVIRFFPISCSHLECRFTFFLTQALLNDKHSNQTVKRSPPTTINSCPVGEAPSPYNSRFESVASASACHDGMULTIGISGFIN 200
H1N1-2009 101 .....S.....P.....I...I..V.....IN..... 200
H5N1Anhui 081 .....S.....P.....I...H.....TS..... 180

H1N1-1918 201 GAVAVLKYNGLITDTIKSURNHLSLTSEACAVNGSCFTINTGPNNGOASYKILKIEKGVTKSIELNAPNYHYECSCYPDTGKVMCVCDNNGHNS 300
H1N1-2009 201 .....V...D.....FR...IV..V.H.....SSEIT..... 300
H5N1Anhui 181 .....V...V.....F.H...V..V.....A.EIT..... 280

H1N1-1918 301 RPYVSFDQNLDDYQIGYICSGYFGDNFRPNQDTSCGPYSSMGANGIRGFSFRYDNGVNIORTKSTSSRSGFENIWDPNQMTETDSFSFVRQDIVAITDS 400
H1N1-2009 301 .....N...E.....I.....K.....G.....I..N.....G..NM..IK...G.NE... 400
H5N1Anhui 281 .....N...E.....I.....P..Y...K.G.....N.....N...KQ..... 380

H1N1-1918 401 GYSGSFVQNHFLTGLDCNRPFCFVVELIRGQPKENTINTSGSSISFCGVNSDVTGUSWPDGAELFFSIDK 469
H1N1-2009 401 .....I.....R.....T... 469
H5N1Anhui 381 .....I.....R...S.....S.....T... 449

```

Рисунок 9 - Выравнивание аминокислотных последовательностей гемагглютинаина и нейраминидазы вирусов гриппа 1918г., А/Н1N1/2009pdm и птичьего вируса гриппа А/Н5N1 [180].

Жирным шрифтом выделены сигнальные пептиды НА и NA, гомологи последовательностей представлена обычным образом (точками), красным цветом обозначен сайт расщепления НА1 и НА2 у вирусов А/Н5N1, голубым цветом – аминокислотные остатки, вовлеченные в третичной структуре в образование сайта связывания с сialовым рецептором, серые прямоугольники – потенциальные сайты гликозилирования, зеленым цветом – консервативные аминокислотные остатки активного центра NA

1.8 Циркуляция вируса гриппа в популяции свиней на территории Казахстана

ВГ из-за большого количества хозяев и высокого зоонозного потенциала представляет повсеместную опасность заражения не только свиней, но и других сельскохозяйственных продуктивных животных: крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, верблюдов, и птиц, особенно при наличии общих пастбищ и водопоев. Производство и торговля продуктами животного происхождения являются важным сектором государственной экономики, что обусловлено не только особенностями казахстанской культуры, но и стремлением выйти с экспортом отечественной продукции на мировой рынок. Так, по данным Комитета по статистике Министерства национальной экономики Республики Казахстан, на начало 2020 г. поголовье КРС составило 7 436,4 тыс. голов, свиней - 813,3, овец и коз – 19 155,7, лошадей – 2 852,3, верблюдов, и птиц всех видов – 45,0 млн голов. В современных условиях для развития и улучшения данного сектора наша страна нуждается в улучшении мер эпизоотологического

и экономического характера по контролю и предотвращению распространения эпизоотических инфекций.

Большую опасность с точки зрения распространения ВГ представляют пути пересечения миграций диких животных (в частности диких кабанов), и, особенно, перелетных птиц с сельскохозяйственными пастбищами и природными водоемами. В условиях природных пастбищ не исключен контакт сельскохозяйственных и диких животных и дальнейшее распространение через них ВГ среди домашних свиней и передачи инфекции от свиней людям. Из-за прямой и обратной взаимосвязи между людьми и свиньями страны запрещали импорт свинины и продуктов свиноводства из стран, где были подтверждены случаи заболевания. Следует отметить, что первая пандемия XXI столетия, вызванная вирусом – реассортантом с уникальной комбинацией генов вирусов H1N1, H1N2, H3N2 птиц, свиней и человека, унесла жизни более полумиллиона человек по всему миру [135].

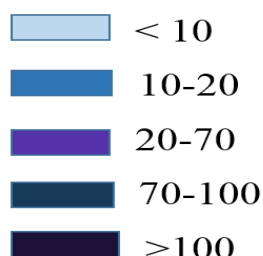
Контроль и предотвращение эпизоотий гриппа среди свиней представляют собой предмет осуществления эффективного международного сотрудничества по предотвращению трансграничного распространения инфекционных болезней животных, представляющих собой риск зоонозных инфекций человека, как для ветеринарных организаций ФАО и МЭБ, так и ВОЗ. Данная проблема представляется серьезной также и для Казахстана, как члена международного сообщества, обладающего огромной территорией с несколькими путями миграций диких птиц и протяженной сухопутной границей.

С целью выявления циркуляции ВГС на территории РК с 2012 по 2017 гг. проведен эпизоотический мониторинг. По данным Комитета статистики РК на 1 октября 2021 г. поголовье свиней в Республике составило 960,8 тыс. голов. Мониторинг охватил семь областей РК, где развито свиноводство и наблюдается наибольшее количество поголовья свиней (рисунок 9). На рисунке 9 представлено географическое расположение мест сбора биологических проб от свиней с 2012 по 2021 гг. и количество свиноголовья в каждой области РК на 2021 год. Как известно, Казахстан занимает девятое место в мире по площади территории, в связи с чем результаты мониторингового исследования разделены на пять основных географических районов: Западный, Северный, Восточный, Южный и Центральный Казахстан.

На западе Республики ежегодному мониторингу подлежали Актюбинская область – 62,8 тыс. голов; на севере: Северо-Казахстанская – 258,3 тыс., Павлодарская – 77,5 тыс и Костанайская – 214,5 тыс.; на востоке – Восточно-Казахстанская – 78,7 тыс.; на юге – Алматинская – 63,1 тыс. и в центре - Карагандинская – 84,5 тыс. особей. Следует отметить, что поголовье свиней в частных подворьях и животноводческих хозяйствах в различных регионах РК распределено крайне неравномерно. Наибольшее количество свиноголовья регистрируется в Северо-Казахстанской и Костанайской областях, а наименьшее в Мангистауской, Атырауской, Кызылординской, Туркестанской, Жамбылской и Западно – Казахстанской, где количество свиней не превышает 30 тыс. голов.



Количество свиноголовья
в различных регионах РК (тыс. голов)



▼ - точки отбора вирусологических проб

Рисунок 9 - Карта, показывающая плотность свиней в РК на 2021 год и географическое расположение мест сбора биологических проб от свиней 2012–2021 гг.

В связи с этим сбор биопроб проводился в крестьянских животноводческих хозяйствах, расположенных в семи областях с наибольшим количеством поголовья свиней. Так, в эпидемические периоды 2012–2017 гг. в популяциях свиней животноводческих хозяйств Актыубинской, Алматинской, Восточно-Казахстанской, Карагандинской, Павлодарской, Костанайской и Северо-Казахстанской областей Республики Казахстан собрано 1720 носоглоточных смывов.

На рисунке 10 представлены результаты обследования на грипп свиней 2-6-месячного возраста, содержащихся в крестьянских хозяйствах и животноводческих комплексах. Процентное соотношение собранных носоглоточных смывов составило: в Актыубинской – 19,99%, Алматинской – 8,81%, Восточно-Казахстанской – 14,57%, Карагандинской – 22,62%, Костанайской – 18,04%, Павлодарской – 10,41% и 5,55% в Северо-Казахстанской.

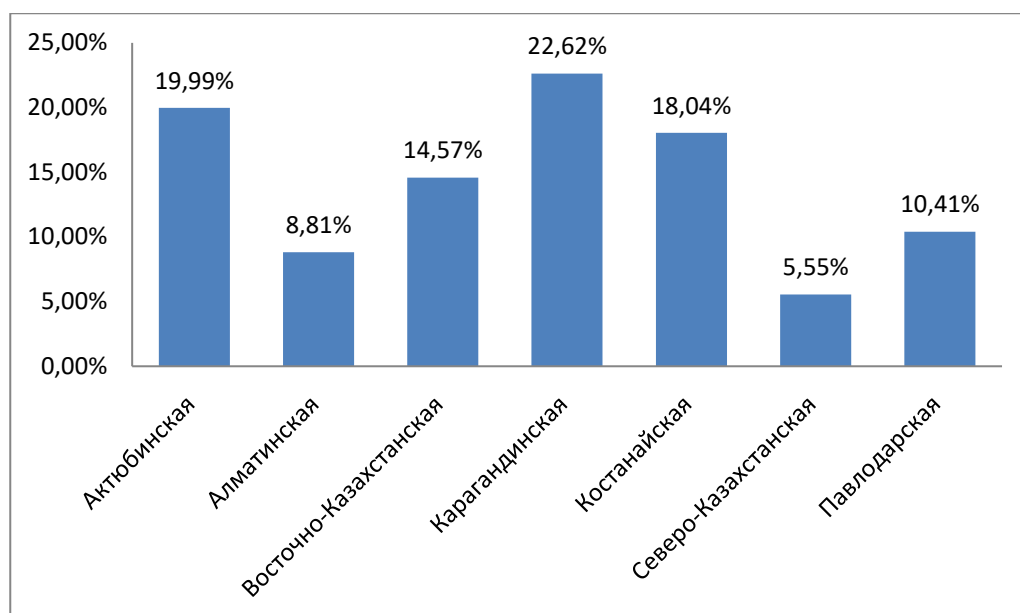


Рисунок 10 – Процентное соотношение носоглоточных смывов, собранных в различных регионах Казахстана с 2012 по 2017 гг.

Результаты первичного скрининга в РТ-ПЦР 1720 собранных носоглоточных смывов показаны на рисунке 11. РНК ВГ(А) обнаружена в 398 биопробах, что составляет 23,14% от общего числа проб. Как показано на рисунке 11, процент инфицированных животных остается на одном уровне, в среднем от 18,00 до 48,70 процентов.

Лабораторная диагностика методом РТ-ПЦР 398 биопроб, положительных на грипп типа А, выявила наличие двух подтипов: А/Н1N1 в 259 биопробе, что составляет 64,78% от всех ПЦР-положительных проб и А/Н3N2 в 15 носоглоточных смывах или 4,03% от позитивных проб. В 116 смывах (31,18%) установить подтип ВГ(А) не удалось (рисунок 12). В соответствии с рисунком 12, преобладающим подтипом ВГ(А) является А/Н1N1 – 259 положительных проб.

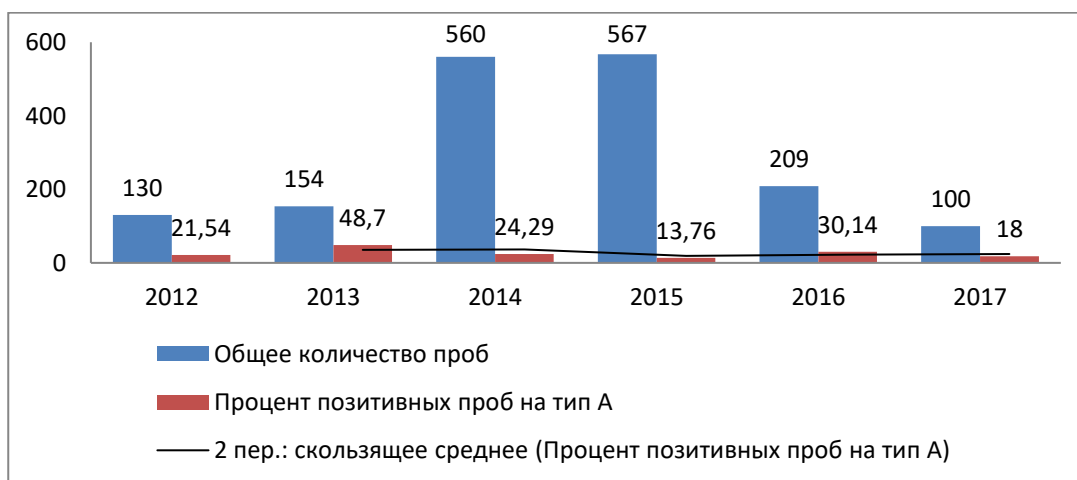


Рисунок 11 – Общее количество носоглоточных смывов и положительных проб на тип А, собранных с 2012 по 2017 гг.

В целом, частота выявления положительных проб на подтипы ВГ А/Н1N1 и А/Н3N2 в период с 2012 по 2017 гг. различалась, в тоже время, оба подтипа ВГ были активны на протяжении всего периода.

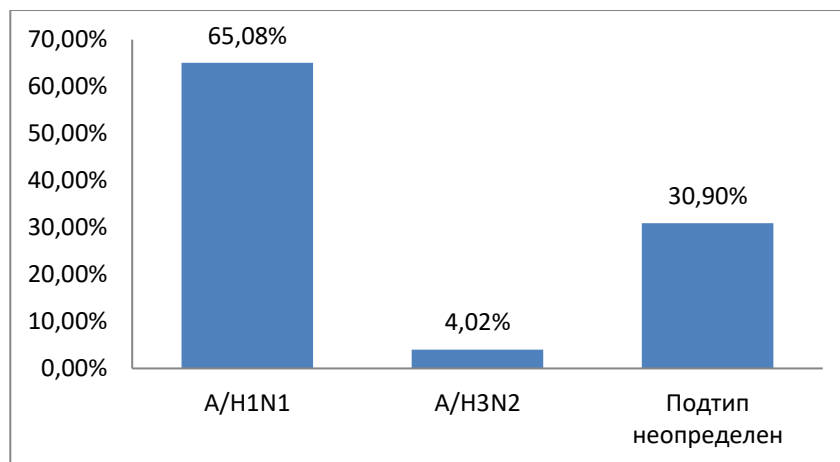


Рисунок 12 – Долевое соотношение подтипов А/Н1N1 и А/Н3N2 от всех ПЦР положительных проб на тип А, собранных с 2012 по 2017 гг.

Сравнительный ретроспективный анализ распространения ВГС в крестьянских и животноводческих хозяйствах в разрезе областей РК за период 2012 – 2017 гг. выявил, что регистрация ВГ(А) отмечается из года в год в каждой исследуемой области (рисунок 13) [181]. Исходя из данных рисунка 13, следует отметить, что процентное соотношение ВГС среди популяции свиней Казахстана в каждой области варьирует в пределах 4,00 - 85,11.

Таким образом, эпидемические сезоны 2012 – 2017 гг. характеризовались социркуляцией ВГ А/Н1N1 и А/Н3N2, с преобладанием А/Н1N1 в популяциях свиней на территории Казахстана.

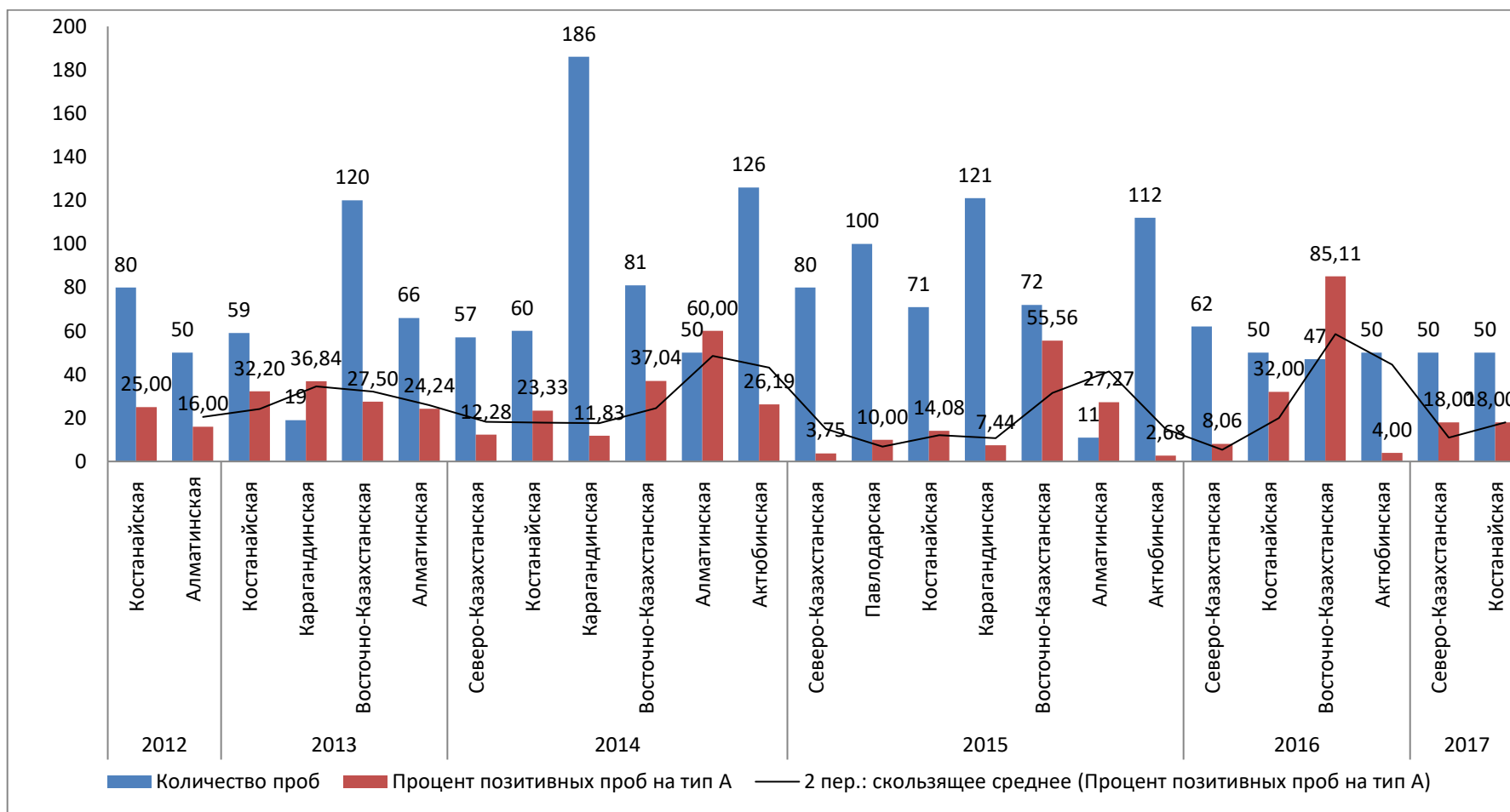


Рисунок 13 – Процент соотношения положительных проб на тип А к количеству носоглоточных проб в разрезе областей РК за период 2012 – 2017 гг.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

2.1.1 Штаммы и сыворотки вирусов гриппа

В работе использованы ВГ с антигенными формулами А/Н1N1, А/Н3N2 и типа В, из которых шесть штаммов ВГС, изолированные с 2018 по 2019 гг., четыре изолята ВГ, выделенные от свиней в 2012 и 2014 гг. и семь референсных штаммов, хранящиеся в коллекции лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии» (таблица 4) и четыре гриппозных диагностикума: А/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm, А/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), В/Phuket/3073/2013 (В/Yamagata Lineage) и В/Colorado/06/2017 (В/Victoria Lineage) производства ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России (г. Санкт-Петербург).

Таблица 4 – Характеристика казахстанских и эталонных штаммов вируса гриппа

№	Полное наименование изолята	Титр РГА	Инфекционная активность, lgЭИД _{50/0,2мл}
1.	А/свинья/Алматы/45/19	1:1024*	3,82
2.	А/свинья/Павлодар/44/19	1:1024	5,82
3.	А/свинья/Павлодар/43/19	1:1024	5,43
4.	А/свинья/Петропавловск/03/18	1:512	7,98
5.	А/свинья/Петропавловск/02/18	1:1024	7,82
6.	А/свинья/Петропавловск/01/18	1:1024	6,50
7.	А/свинья/Актобе/15/14	1:512	3,43
8.	А/свинья/Актобе/10/14	1:1024	4,23
9.	А/свинья/Костанай/23/14	1:1024	4,23
10.	А/свинья/Костанай/06/12	1:128	4,67
11.	А/California/04/09 (H1N1) pdm	1:512	8,00
12.	А/New Jersey/8/76 (H1N1)	1:512	8,78
13.	А/swine/USA/1976/31 (Hsw1N1)	1:1024	8,0
14.	А/swine/Iowa/15/30 (Hsw1N1)	1:1024	8,8
15.	А/Wisconsin /67/05 (H3N2)	1:1024	2,77
16.	А/Perth/16/09 (H3N2)	1:256	9,5
17.	А/Panama/2007/99 (H3N2)	1:1024	9,77
Примечание - *титры гемагглютинирующей активности в РГА.			

Для постановки РТГА использовали кроличьи сыворотки, полученные ранее к референсным штаммам ВГ(А) подтипов H1N1, H1N1 pdm, Hsw1N1 и H3N2 (таблица 4) и хранящиеся в коллекции лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», так и коммерческие наборы диагностических сывороток к ВГ (А) и (В) производства ООО «ППДП» (г. Санкт-Петербург, Россия) [182].

2.1.2 Системы культивирования для изоляции вирусов гриппа

Для изоляции и клонирования ГАА ВГС использовали 9-11-суточные РКЭ из птицефабрики АО «Аллель Агро» (Алматинская обл., Казахстан) и перевиваемые линии клеток MDCK и СПЭВ из коллекции клеточных линий человека и животных ТОО «Научно-производственное предприятие «АНТИГЕН»» (г. Алматы, Казахстан):

- MDCK (Madin-Darby canine kidney, перевиваемая культура клеток эпителия почки собаки, ATCC Catalogue of Cell Lines a.Hybridoma, 7-ed, 1992, :21);

- СПЭВ (свиная почка эмбриональная версинированная, Тез. докл. 2-й научной конф. МНИИВП. М., 1960.57, НИИ вирусологии РАМН; НИИ гриппа РАМН; ИНЦ РАН).

2.1.3 Лекарственные препараты

Для определения лекарственной устойчивости вирусов изучали действие четырех препаратов, вошедших в Перечень лекарственных средств Клинического протокола диагностики и лечения ГРИППа и ОРВИ (Одобрено Объединенной комиссией по качеству медицинских услуг МЗ РК от «19» апреля 2019 г. Протокол №63) [183]:

- Ремантадин - гидрохлорид римантадина (альфа-метилтрицикло[3.3.1.1/.7]декан-1-метанамин 100 мг/капсула, АО «Olainfarm», Латвия, РК-ЛС-5№019143;
- Тамифлю - фосфат осельтамивира (этил(3R,4R,5S)-5-амино-4-ацетамидо-3-(пентан-3-илокси)-циклогекс-1-ен-1-карбоксилат) 75 мг/капсула, «Cenexi SAS», Франция, упаковано «F. Hoffmann-La Roche AG», Швейцария РК-ЛС-5№004498;
- Арбидол - умифеновир гидрохлорида моногидрат в пересчете на умифеновира гидрохлорид (этиловый эфир 6-бром-5-гидрокси-1-метил-4-диметиламинометил-2-фенилтиометилиндол-3-карбоновой кислоты) 100 мг/капсула, ОАО «Фармстандарт-Лексредства», г. Курск, Россия, РК-ЛС-5№014944;
- Ингавирин - имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты – витаглутам, 90 мг/капсула, ОАО «Валента Фармацевтика», Россия, РК-ЛС-5№014881 [184, 185].

2.2 Методы исследования

2.2.1 Сбор носоглоточных смывов и венозной крови

Носоглоточные смывы собирали стерильными ватными тампонами, которые погружали в 2 мл транспортной среды 199 с 0,5% бычьим сывороточным альбумином и комплексом антибиотиков (пенициллин 50 000 ед/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, гентамицин 3 000 мкг/мл, нистатин 5 000 ед/мл). Пробы выдерживали в течение суток при 4°C и хранили в жидком азоте (-196°C).

Кровь для РТГА брали из хвостовой или ушной вены в вакуумную пробирку с разделительным гелем и хранили в штативе в вертикальном положении при температуре 2 – 4°C [186].

2.2.2 Серологический анализ сывороток крови

Специфические антитела в сыворотках крови, собранных из ушной или хвостовой вены свиней, определяли в РТГА.

К последовательно разведенным испытуемым сывороткам от 1:10 до 1:640 в объеме 25 мкл добавляли равное по объему (25 мкл) количество определенного вида вируса в четырехкратном титре. Плашку встряхивали и к смеси добавляли равное количество 50 мкл 0,75% взвеси куриных эритроцитов. Тщательно перемешав смесь, плашку инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Защитный уровень антител в крови в РТГА определяли как значение титра антител 1:40 и более [187].

2.2.3 Освобождение сывороток от неспецифических ингибиторов

Для удаления неспецифических термостабильных γ -ингибиторов иммунные сыворотки обрабатывали рецепторразрушающим энзимом (RDE) из неочищенного фильтрата V. Cholerae (Denka Seiken Co. Ltd. Tokyo, Япония). К 1 части неразведенной сыворотки добавляли 3 объема RDE в рабочем разведении 1:50. Смесь оставляли при 37°C в течение 18 ч., затем добавляли 6 частей физиологического раствора для получения конечного разведения сыворотки 1:10.

Для удаления термолабильных ингибиторов типов α и β сыворотки прогревали при температуре 56°C в течение 30 мин.

2.2.4 Изоляция и клонирование вирусов гриппа

Для выделения ВГС из ПЦР положительных носоглоточных смывов и клонирования ГАА использовали 90-100% монослой перевиваемых линии клеток MDCK и СПЭВ, обладающих наибольшей чувствительностью к ВГ, с применением наборов реактивов производства Invitrogen (ThermoFisher Scientific) (США) [188] и Sigma-Aldrich (Merck) (Германия) [189].

Перевиваемые линии клеток MDCK и СПЭВ культивировали на матрасах объемом 75 см³ с использованием ростовой среды, состоящей из питательной среды Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), либо Minimum Essential Media (MEM), 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и антибиотиков Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL, Pen Strep). Для снятия полного монослоя клеток использовали 0,25% Trypsin-EDTA (1X). Подсчет клеток проводили после окрашивания 0,4% Trypan Blue Solution.

Перед заражением сформированный 90-100% монослой КК три раза промывали стерильным раствором Hank's balanced salt solution, чтобы удалить сывороточные антитела и ингибиторы. В каждую пробирку со скошенным дном вносили по 0,1-0,2 мл вируссодержащего материала, проверив на бактериальную стерильность. После 30-60 мин контакта при 37°C в термостате

вносили по 2,5-3 мл поддерживающей среды, состоящей из питательных сред Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), либо Minimum Essential Media (MEM) с 5% БСА и 1М HEPES-буфера и с добавлением 0,01% TPCK-treated трипсина.

С целью выявления цитопатогенного действия (ЦПД) ВГ вели ежедневное наблюдение за инфицированным монослоем клеток при помощи широкопольного инвертированного микроскопа (Meiji Techno TC5200, Япония) под увеличениями x10, x20 [190-192].

Изоляцию и клонирование гемагглютинирующих агентов (ГАА) проводили также на 9-11 дневных РКЭ с инокуляцией вирусного материала объемом 300 мкл в хорион-аллантаическую полость. Инфицированные КЭ инкубировали в термостате с вентиляцией (Binder KT 115 Е6, Германия) в вертикальном положении при 35⁰С в течении 36 часов. Наличие ВГ подтверждали в реакции гемагглютинации (РГА).

2.2.5 Идентификация изолированных штаммов

Идентификацию изолятов проводили в РТГА и РИНА микрометодом согласно рекомендации ВОЗ [189, 193, 198], а также в РТ-ПЦР с применением наборов реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва, Россия) (таблица 5) [193].

Идентификацию подтипов НА выделенных казахстанских изолятов ВГС 2018-2019 гг. в РТГА осуществляли с использованием двухкратных разведений ряда диагностических сывороток в объеме 0,025 (0,05) мл соединенных с равным объемом рабочего разведения (4 АЕ) вируса. Рабочее разведение антигена, содержащееся в 0,025 мл 4 АЕ, готовили путем разведения антигена ФБС во столько раз, сколько получают от деления на 8 числа, соответствующего гемагглютинирующему титру.

2.2.6 Молекулярно-биологические методы исследования

2.2.6.1 Полимеразно-цепная реакция в режиме «реального времени»

Первичный скрининг биологических образцов и идентификацию изолированных штаммов выполняли в ПЦР в режиме «реального времени» с гибридизационно - флуоресцентной детекцией. Выделение РНК и проведение реакции обратной транскрипции РНК (синтез кДНК) осуществляли с использованием комплектов реагентов «РИБО-преп» и «РЕВЕРТА-L». Амплификацию проводили на приборе Rotor Gene Q6 (QIAGEN, Германия) с применением наборов реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (г. Москва, Россия) (таблица 5) [194].

Полученные результаты интерпретировали на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по каналам FAM/Green, JOE/Yellow и ROX/Orange для контрольных образцов и проб кДНК, выделенных из исследуемых образцов.

Таблица 5 – Наборы реагентов и их гены-мишени для определения типов и подтипов вирусов гриппа

Полное наименование набора реагентов Вариант FRT	Ген-мишень	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)
АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL	М ген ВГ (А) и NS ВГ (В)	1х10 ³ ГЭ/мл*
АмплиСенс® Influenza virus «ГРИПП»		5х10 ³ ГЭ/мл
АмплиСенс® Influenza virus А-тип -FL	НА и NA ВГ типов А/Н1N1 и А/Н3N2	1х10 ³ копий/мл
АмплиСенс® Influenza virus А/Н1-swine-FL	НА ВГ А/Н1 swine pdm/09	1х10 ³ копий/мл
АмплиСенс® Influenza virus А-тип-Н5, Н7, Н9-FL	Н5, Н7, Н9	1х10 ³ ГЭ/мл
Примечание - * Количество геномных эквивалентов микроорганизмом в 1 мл образца клинического материала.		

2.2.6.2 Подготовка ПЦР-продуктов к секвенированию

Выделение РНК из носоглоточных смывов и очищенного вируса объемом 250 мкл с целью амплификации и последующего секвенирования проводили с использованием комплекта реагентов PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, США). Количественные измерения РНК осуществляли с помощью набора Qubit RNA HS (High Sensitivity, Invitrogen, США) согласно инструкции, для флюориметра Qubit 2.

ОТ-ПЦР провели с использованием комплекта реагентов Super Script IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, США) и праймера Tuni12 при следующих условиях: обратная транскрипция при 48°C - 45 мин, начальная 2 мин. денатурация при 95°C и амплификация в 30 циклах, включающая денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг праймеров (52°C, 30 сек) и удлинение цепи (72°C, 30 сек) с последующей окончательной элонгацией при 72°C, 10 мин.

Для последующей амплификации полученной кДНК был использован набор реагентов Phusion High-Fidelity DNA Polymerase и праймеры для каждого сегмента [195]. Амплификацию сегментов ВГ осуществляли при следующем режиме:

- Денатурация - 95 °С-5мин;
- ПЦР амплификация, 40 циклов:
- Денатурация - 94°C -1 мин,
- Отжиг праймера - 57°C -1 мин,
- Элонгация - 72 °С- 1 мин;
- Финальная элонгация - 72 °С- 5 мин.

Перед внесением ПЦР продуктов в реакцию секвенирования по Сэнгеру произвели ферментативную очистку ПЦР продуктов набором ExoSAP согласно инструкции производителя.

Для NGS секвенирование очистку ПЦР продуктов от dNTP, солей, димеров праймеров и других примесей выполнили обратимой твердофазной иммобилизацией нуклеиновых кислот на парамагнитных частицах AMPure XP согласно инструкции производителя.

Концентрацию продуктов ПЦР оценивали спектрофотометрически на приборе Qubit 2.0 с применением набора Qubit dsDNA HS Assay Kit.

Электрофорез продуктов амплификации ДНК вирусов проводили в 2% растворе высокоочищенной агарозы в трис-ацетатном буфере (Invitrogen, США) в камере Scie-Plas HU-10 при напряжении 88V (8 вольт/см) на оборудовании Consort EV215 (Cleaver Scientific, Великобритания). Визуализацию ДНК проводили в Гель документирующей системе GelMax 125 Imager (Upland, CA, США).

2.2.6.3 NGS секвенирование на платформе Illumina MiSeq

Определение нуклеотидной последовательности полного генома ВГ осуществляли путем NGS секвенирования на платформе Illumina MiSeq.

ДНК- библиотеки готовили из полученных ПЦР продуктов (каждого из сегментов вируса гриппа) с использованием набора Illumina DNA Prep, (M). В ходе подготовки библиотек было проведено тагментирование ДНК, лигирование сиквенсных адаптеров и их амплификация. Баркодирование библиотек осуществляли с использованием набора Nextera DNA CD Indexes.

Анализ качества геномных библиотек был проведён при помощи биоанализатора на основе капиллярного электрофореза Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) с использованием набора DNA 12000 Kit

Определение нуклеотидной последовательности генов вируса гриппа осуществляли путем NGS секвенирования на платформе Illumina MiSeq, с использованием набора MiSeq Kit v3 (Illumina, США), позволяющего получать парноконцевые чтения длиной 300 п.н.

После завершения секвенирования на приборе Illumina MiSeq были получены файлы в формате fastq. Качество полученных ридов определяли с помощью программы FastQC. На протяжении большей части длины ридов качество секвенирования оставалось стабильным во всех образцах. Среднестатистические значения качества ридов были выше 20 единиц по Phred Score. Анализ нуклеотидного состава по позициям в ридах показал в среднем равномерное распределение независимо от локализации в сиквенсе, за исключением последних 100 нуклеотидов. После оценки качества ридов, был проведен тримминг сиквенсов с использованием инструментов, имплементированных в платформе Galaxy. Были удалены последние 100 нуклеотидов. После проведенной оптимизации, качество полученных ридов соответствовало Q25 – Q30.

Сборку нормализованных ридов проводили на референс-геном, в качестве которого использовали комбинированный геном в формате fasta, включающий последовательности генов, относящихся к разным антигенным группам.

Для выравнивания полученных ридов на референтный геном, использовали программу Bowtie2, имплементированную в пакете программ UGENE v.1.32.0.

В ходе выравнивания ридов на референс-гены, были обнаружены небольшие пробелы в последовательностях. Для закрытия обнаруженных в генах пробелов проводили отдельное дополнительное секвенирование генов по технологии Сэнгера на приборе AppliedBiosystems 3100 (США). Полученные риды позволили закрыть отсутствующие участки.

По полученным нуклеотидным последовательностям генов белков ВГС построены филогенетические деревья по методу Neighbor Joining с однопараметрическим алгоритмом Джукса-Кантора и значением Max Seq Difference равным 0,5. Для построения древ использовали программное обеспечение Mega6.06 и Tree Viewer version 1.17.5, имплементированное в базе данных NCBI.

Для определения характера аминокислотных замен использовали таблицу физико-химических дистанций Р. Грентсема [188], учитывающую три параметра взаимозаменяемых аминокислотных остатков: полярность, объем и состав, определяемый как соотношение атомных масс неуглеродных атомов, входящих в концевые группы или кольца, к атомным массам углеродов боковых радикалов. При значении физико-химической дистанции большем 57,9 замена считается консервативной, в обратном случае – радикальной [196]. Согласно представлениям Р. Грэнтсема (1974), основными детерминантами эволюции белков являются физико-химические силы. Р. Грэнтсем считает, что эволюционное различие между аминокислотами, определяемое их относительными частотами замены (relative substitution frequency, RSF), зависит от физико-химических свойств их боковых радикалов. Другими словами, вероятность замены одной аминокислоты на другую тем выше, чем ближе их физико-химические свойства. Наиболее сильно с RSF коррелируют несколько свойств боковой цепи аминокислот: состав, полярность и объем ($r = 0,49, 0,47$ и $0,37$ соответственно). Состав (с) определяется как отношение атомных масс неуглеродных элементов в концевых группах или кольцах к атомным массам углеродов, входящих в боковую цепь. Это довольно простой способ отражения различий состава между аминокислотами. Например, боковая цепь серина — CH_2OH , $c = 17/12$ (1,42), лизина — CCCCNH_2 , $c = 16/48$ (0,33). Различие состава этих аминокислот можно вычислить по формуле: $c_{\text{сер}} - c_{\text{лиз}} = 1,42 - 0,33 = 1,09$. [197].

2.2.6.4 Секвенирование по технологии Сэнгера

Для закрытия обнаруженных в генах пробелов проводили отдельное дополнительное секвенирование генов по технологии Сэнгера на приборе ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Определение нуклеотидной последовательности фрагментов кДНК вирусов проводили с использованием набора для термоциклического ПЦР секвенирования (Seq PCR) по Сэнгеру BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, США), согласно инструкции изготовителя. Электрофорез ДНК осуществляли на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Очистку продуктов ПЦР-секвенирования проводили спиртовым осаждением:

К 10 мкл образца добавляли 40 мкл полученной смеси из 3М ацетата Na pH 4.6, 95% C₂H₅OH, перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Далее к осадку добавляли 150 мкл 75% этанола, перемешивали и осаждали центрифугированием при 15600g в течение 30 мин. при температуре 4°C. Супернатант выбрасывали, осадок подсушивали при 56°C в течение 2 мин. и растворяли в формамиде, с последующим инкубированием при комнатной температуре. Далее денатурировали при 95°C в течение 2 мин., затем охлаждали во льду и загружали в автоматический генетический анализатор [198].

2.2.7 Методы изучения биологических свойств вирусов гриппа свиней

Наличие и гемагглютинирующий титр ВГС в аллантоисной и культуральной жидкостях, инфицированных КЭ и КК МДСК, определяли в РГА общепринятым методом с использованием 0,75% взвеси куриных эритроцитов [189, 199, 200].

Инфекционную активность выделенных штаммов ВГС по методу L. Reed и H. Muench [201] определяли на КЭ и КК МДСК на основании оценки эмбриональной инфекционной дозы и тканевой цитопатогенной дозы и выражали в lgЭИД_{50/0,2} мл и lgТЦД_{50/0,2} мл, соответственно.

Термочувствительность НА определяли по разнице титров НА до и после прогревания при 56°C в течение 5, 15, 30, 60 и 120 мин [202].

Спектр гемагглютинирующей активности штаммов ВГС выявляли в РГА с 0,5% суспензиями эритроцитов курицы, морской свинки, барана, лошади, человека «0» группы [203].

Оценку скорости адсорбции вирусов проводили на формализированных куриных эритроцитах при постоянном помешивании при 4°C в течение 18 ч. и по титру НА в надосадочной жидкости высчитывали процент адсорбировавшегося вируса. Скорость элюции с эритроцитов определяли в забуференном физиологическом растворе при 37°C и высчитывали процент элюировавшегося вируса через 30, 60, 120, 180, 240 мин.

Чувствительность выделенных штаммов к сывороточным неспецифическим ингибиторам определяли в РТГА с нативными и прогретыми (62°C - 30 мин, 100°C – 10 мин) сыворотками крови морской свинки, курицы и кролика.

2.2.8 Чувствительность к различным концентрациям противовирусных препаратов

Для определения лекарственной устойчивости изолированных штаммов ВГС изучали действие в активной форме четырех коммерческих препаратов: Ремантадина, Тамифлю, Арбидола и Ингавирина, включенных в Государственный реестр лекарственных средств и медицинских изделий [183, 184].

В экспериментах препараты разводили в ФБР (ph7,2) в концентрации 50 мг на 1 мл раствора и выдерживали около 30 мин. при температуре 36,6°C до полного их растворения.

Эмбриотоксичность противогриппозных препаратов определяли путем их введения в объеме 0,2 мл ФБР (в дозах от 10 мг до 0,04 мг) в хорионаллантоисную полость эмбриона. Контролем служила группа, которой вводили раствор ФБР без добавления препарата. Результаты учитывались по количеству погибших КЭ в течение всего периода до вылупления цыплят [204].

Вирусингибирующую активность изучали путем добавления равного объема исследуемого ВГС (100 ЭИД_{50/0,2мл}) к препарату в разведении от исходного до 1:256 (от 50 мг/мл до 0,20 мг/мл). Полученную смесь выдерживали 60 мин при 36,6°C, затем вводили в аллантоисную полость КЭ в объеме 0,2 мл. Контролем служили две группы эмбрионов: 1-ая – чистый раствор ФБР, 2-ая – вирус в смеси с равным объемом ФБР. Опытные и контрольные группы КЭ инкубировали при 36,6°C в течение 48 ч. Противовирусное действие определяли по наличию гемагглютинирующей активности вируса в аллантоисной жидкости.

Чувствительность выделенных штаммов ВГС к различным концентрациям противовирусных препаратов оценивали по степени подавления репродукции 100 ЭИД_{50/0,2 мл} вируса различными концентрациями препаратов в КЭ [205]. Дозу препарата, подавляющую титр вируса в РГА в два раза по сравнению с контролем, считали ингибирующей концентрацией (ИК50). Для каждой комбинации концентрации препарата проводили три независимых эксперимента по пять куриных эмбриона в каждом из них.

2.2.9 Изучение антигенных взаимосвязей штаммов вируса гриппа свиней

Антигенные свойства поверхностных гликопротеидов шести казахстанских изолятов ВГС 2018-2019 гг. исследовали в перекрестной РТГА с использованием кроличьих иммунных сывороток, полученных к пяти североказахстанским изолятам (44/19; 43/19; 03/18; 02/18 и 01/18) и одному алматинскому штамму (45/19), а также референсных сывороток к актюбинским и костанайским штаммам ВГС 2012-2014 гг. и к эталонным штаммам, полученных ранее и хранящихся в коллекции лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии».

2.2.9.1 Концентрация вирусов

С целью концентрации вируса вируссодержащую аллантоисную жидкость осветляли центрифугированием при 4500 об/мин в течение 30 мин при 4°C. Вирусы концентрировали путем ультрацентрифугирования осветленной аллантоисной жидкости на центрифуге "Beckman Coulter Optima L-80" при 29000 об/мин, 120 мин, 4°C. Дальнейшую очистку концентрированного вирусного материала проводили в градиенте плотности сахарозы (20%-60%) [206]. Вирус собирали на границе раздела между 30% и 60%-ми растворами сахарозы, разводили десятикратным объемом ФБР (pH 7,2) и переосаждали центрифугированием при 29000 об/мин в течение 120 мин при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в минимальном объеме ФБР, после чего определяли гемагглютинирующую активность и концентрацию белка.

2.2.9.2 Определение концентрации белка

Количество белка в материале определяли по методу M. Bradford с использованием готового реагента Bradford Reagent (Sigma-Aldrich) при длине волны 590 нм на спектрофотометре PD-303S (APEL, Япония).

Метод основан на связывании Coomassie brilliant blue G-250 с аминокислотными остатками белка, в основном с аргинином, а также с триптофаном, тирозином, гистидином и фенилаланином. При связывании происходит сдвиг максимума поглощения с длины волны равной 465 нм (свободный краситель) до 595 нм (связанный), при которой проводятся все измерения.

Для построения стандартной кривой использовали очищенный сывороточный альбумин в ФСБ в диапазоне концентраций 1–100 мкг/мл. В соответствии с весом белка и соответствующего значения поглощения строилась стандартная кривая и рассчитывался коэффициент детерминации R², которые использовали для определения белка в неизвестных образцах. Количество белка очищенного концентрированного вируса определяли в объеме 0,1 мл, разведенным в ФСБ 1:10. При расчете концентрации учитывалось конечное разведение препарата [207].

2.2.9.3 Получение иммунных сывороток

Специфические гипериммунные кроличьи сыворотки к казахстанским изолятам ВГС получали путем 3-кратной иммунизации кроликов массой 2,5-3 кг очищенным и концентрированным вирусным материалом в смеси с полным и неполным адъювантом Фрейнда (Sigma, Co. St. Louis, США). Предварительно удалив неспецифические ингибиторы путем обработки RDE и прогреванием в течении 30 мин при температуре 56°C.

Концентрированный вирус вводили подкожно в дозе 100-150 мкг/животное с интервалом 14-21 сут. Протокол по проведению работ с животными был одобрен решением локальной этической комиссией (протокол № 5 от 08.10.2019).

Кровь из ушной вены брали через две недели после иммунизации, соответственно 2 и 3 иммунизацию проводили каждые две три недели.

Специфическую активность полученных гипериммунных кроличьих сывороток проверяли в РТГА с вирусами, к которым получали сыворотки, и с коммерческим набором антигенов для диагностики ВГ с антигенными формулами А/Н1N1 и А/Н3N2.

2.2.10 Получение лиофильновысушенных препаратов ВГ и сывороток к ним

Сублимационную сушку препаратов в окружении вакуума в три этапа: замораживание, собственно сушка и досушивание, проводили на лиофильном сушильном устройстве Alfa 1-2 LD_{plus} (Martin Christ, Германия).

В качестве стабилизатора использовали водный раствор 0,75% хлорида натрия с 2% желатиной и 20% сахарозой. Вials с лиофильновысушенными вирусами были заложены на хранение при 4°C.

Предварительное глубокое замораживание препаратов производили 18 ч. при -80°C в ультранизкотемпературном морозильнике (ULUF 65, Дания).

Активность аллантоисных культур после нескольких месяцев хранения при 4°C проверяли в РГА [199] и по методу L. Reed и H. Muench [200].

Активность лиофильновысушенных иммунных сывороток к казахстанским штаммам ВГС 2018 – 2019 гг. после нескольких месяцев хранения при 4°C проверяли в РТГА [199].

2.2.11 Статистический анализ

При статистической обработке для всех серий результатов находили средние геометрические значения титров обратных логарифмов по основанию 2 (geometric mean titer, GMT) и их стандартные отклонения ($\pm$ SD) [208] с помощью программного обеспечения "Microsoft Office Excel 2010" [209].

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Сбор биологических образцов от свиней в различных регионах Казахстана

Для изучения циркуляции ВГ в популяциях свиней в 2018-2021 гг. в свинофермах и крестьянских хозяйствах семи регионах Казахстана (Актюбинская, Алматинская, Восточно-Казахстанская, Карагандинская, Костанайская, Северо-Казахстанская и Павлодарская области) от животных 1,5-6-месячного возраста осуществлен сбор 2144 биопроб, из которых 2055 носоглоточные смывы и 89 сывороток крови. Сыворотки крови получены только в Костанайской области.

На рисунке 14 представлено количество образцов, собранных в свинокомплексах Казахстана с 2018 по 2021 гг.

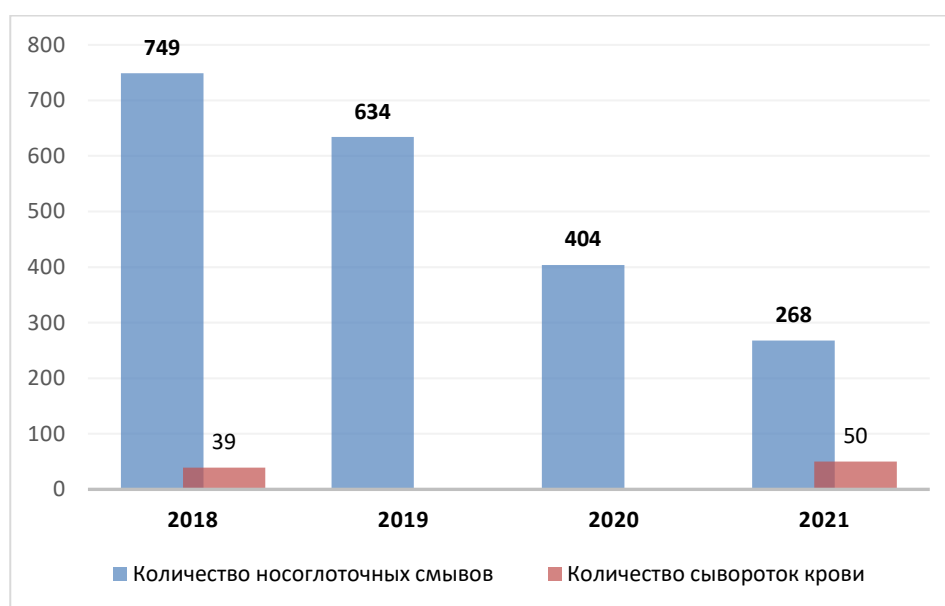


Рисунок 14 – Количество носоглоточных смывов и сывороток крови, собранных в свинокомплексах Казахстана с 2018 по 2021 гг.

Как видно из рисунка 14 в 2018 г. от животных получено 749 носоглоточных смывов, в 2019 г. – 634 пробы, в 2020 г. – 404 образца и в 2021 г. – 268 проб. 89 сывороток крови получено из животноводческих хозяйств Костанайской области: в 2018 г. - 39 проб и 2021 г. - 50 образцов.

На рисунке 15 представлено процентное соотношение свиных носоглоточных смывов, собранных с 2018 по 2021 гг., по областям. Процентное соотношение свиных носоглоточных смывов, собранных в семи областях Казахстана с 2018 по 2021 гг., составило: 6,62% – в Актюбинской, 17,91% – в Алматинской, 14,40% – в Восточно-Казахстанской, 25,30% – в Карагандинской, 12,55% – в Костанайской, 20,19% – в Северо-Казахстанской и 3,02% – в Павлодарской областях (рисунок 15).

В результате мониторинга циркуляции ВГС в свинопоголовьях РК за период 2018 - 2021 гг., наибольшее количество проб собрано в трех областях:

Карагандинской – 520 (25,30%), Северо-Казахстанской – 415 (20,19%) и Алматинской – 368 (17,91%), наименьшее количество получено из Актюбинской – 136 проб (6,62%) и Павлодарской - 62 образца (3,02%). В Восточно-Казахстанской и Костанайской областях собрано 296 и 258 проб (14,40 % и 12,55%), соответственно (рисунок 15). Сыворотки получены только из Костанайской области в 2018 г. (39) и 2021 г. (50).

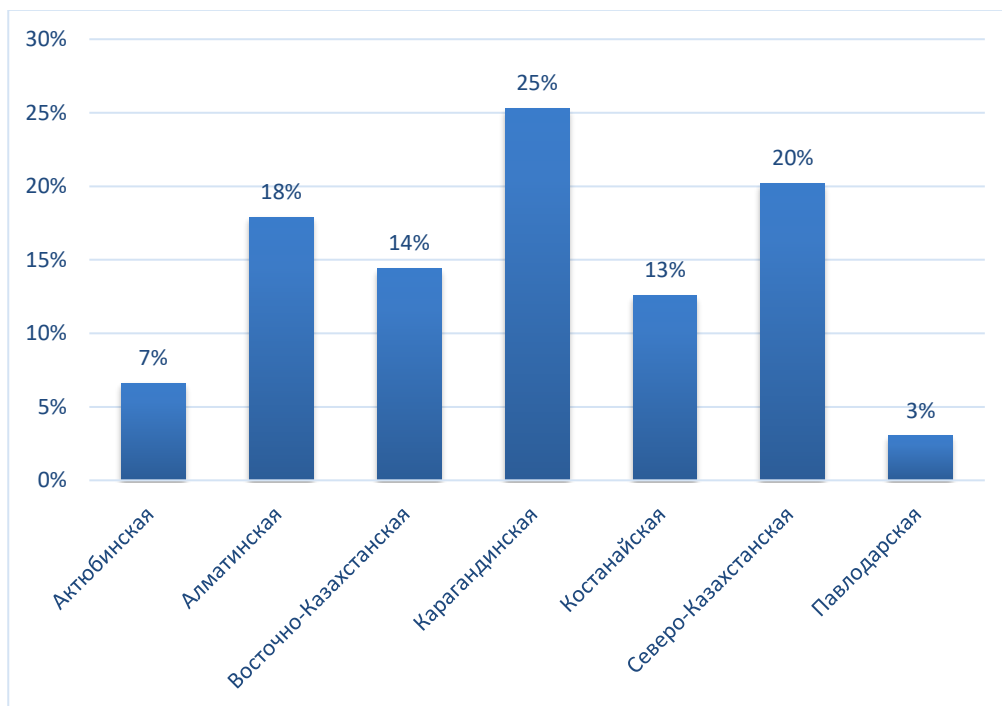


Рисунок 15 – Процентное соотношение носоглоточных смывов, собранных в различных областях Казахстана с 2018 по 2021 гг.

3.2 Скрининг носоглоточных смывов и идентификация подтипов вирусов гриппа свиней

С целью мониторинга циркуляции ВГ в популяциях свиней в эпидемические периоды с 2018 по 2021 гг., провели молекулярно-генетическую диагностику свиных носоглоточных смывов.

Первичный скрининг носоглоточных смывов на обнаружение двух типов РНК ВГ: А и В, с последующей идентификацией подтипов ВГ(А): Н1N1(sw2009), Н3N2 осуществляли в РТ-ПЦР. В связи с тем, что свиньи способны заражаться вирусом гриппа птиц, носоглоточные смывы также проверяли на наличие ВГ(А) Н5, Н7 и Н9.

На рисунке 16 представлено соотношение положительных проб на тип А к общему количеству биопроб, собранных в популяциях свиней РК с 2018 по 2021 гг.

При скрининге в РТ-ПЦР носоглоточных смывов от свиней РНК ВГ(А) обнаружена в 51 пробе (6,81%), в 2019 г. - в 23 пробах (3,63%), в 2020 г. - в 35 пробах (8,66%) и в 2021г. - в семи смывах (2,61%). Процент выявления положительных проб на тип А от общего количества носоглоточных смывов низок, в среднем от 2,61% до 8,66% [210, 211].

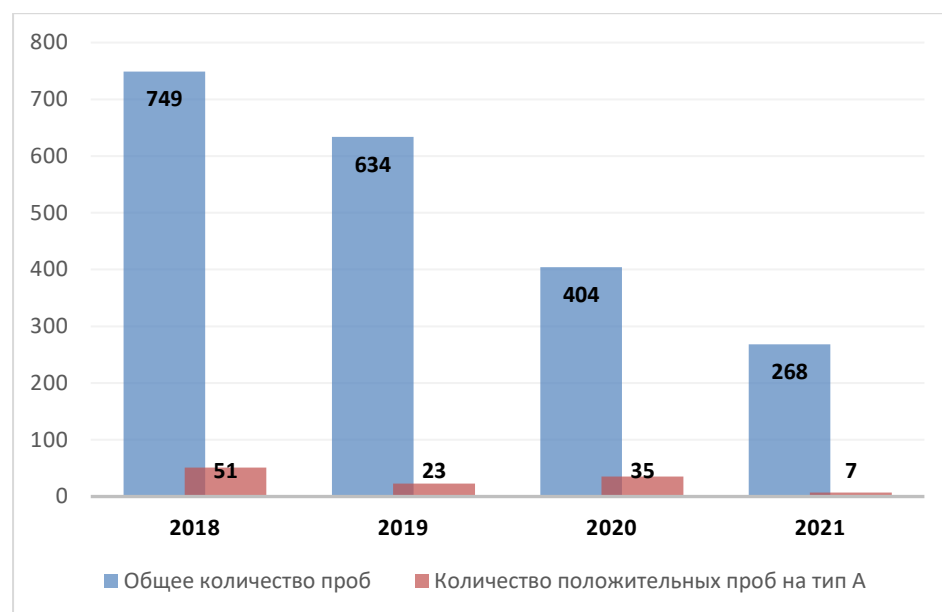


Рисунок 16 – Соотношение положительных образцов на ВГ(А) к общему количеству биопроб, собранных с 2018 по 2021 гг.

Несмотря на низкий процент выявления положительных проб на тип А (2,61-8,66%), первичный скрининг 2055 свиных носоглоточных смывов, собранных за эпидемические периоды 2018–2021 гг., в РТ-ПЦР указывает на ежегодную циркуляцию в популяциях свиней ВГ(А) и отсутствия ВГ типа В.

На рисунке 17 представлено процентное соотношение подтипов ВГ А/Н1N1(sw2009) и А/Н3N2 от общего количества биопроб, собранных от свиней за эпидемические периоды 2018-2021 гг. [212-216].

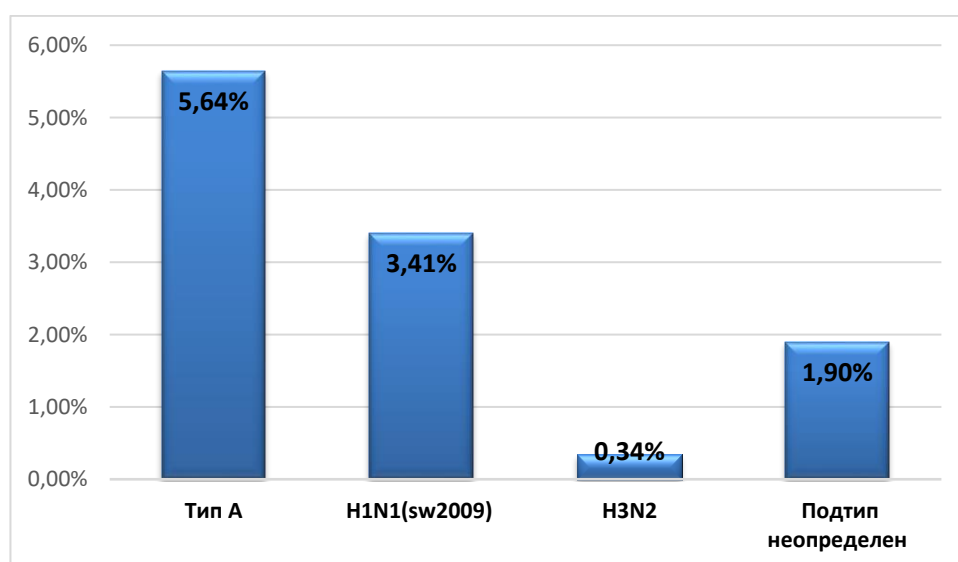


Рисунок 17 – Процентное соотношение подтипов А/Н1N1(sw2009) и А/Н3N2 за эпидемические периоды 2018 - 2021 гг.

Генетический материал ВГ(А) обнаружен в 116 носоглоточных смывах, что составляет 5,64% от общего числа исследованных биопроб. Последующее субтипирование позитивных проб выявило РНК подтипов А/Н1N1(sw2009) и А/Н3N2, где РНК ВГ А/Н1N1(sw2009) составила 3,41% (70 проб) и РНК ВГ А/Н3N2 – 0,34% (7 проб) от общего количества носоглоточных смывов, собранных от свиней за период 2018-2021 гг. В то же время в 39 (1,90%) положительных на тип А пробах субтипы ВГ(А) не определены. Молекулярно-генетическая диагностика 116 положительных на тип А проб не выявила циркуляцию среди свиней ВГ(А) субтипов Н5, Н7 и Н9 (рисунок 17).

На рисунке 18 представлено процентное соотношение подтипов А/Н1N1(sw2009) и А/Н3N2, собранных от свиней за период 2018-2021 гг.

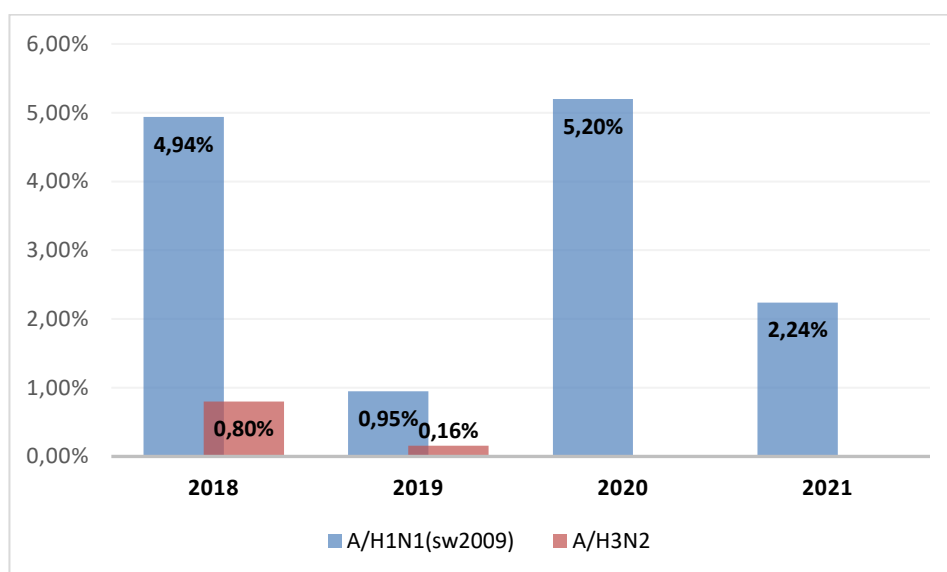


Рисунок 18 – Процентное соотношение подтипов ВГ(А) А/Н1N1(sw2009) и А/Н3N2 от общего количества биопроб за 2018-2021 гг.

Как следует из данных рисунка, подтип А/Н1N1(sw2009) является преобладающим подтипом ВГ(А), выявляясь в пределах 0,95% – 5,20%. РНК ВГ(А) подтипа А/Н3N2 зафиксирована только в биопробах, собранных в 2018-2019 гг., процент позитивных образцов достиг 0,16 - 0,80%.

Таким образом, результаты молекулярно-генетического скрининга подтвердили социркуляцию подтипов ВГ(А) А/Н1N1(sw2009) и А/Н3N2 в животноводческих хозяйствах различных регионов РК в эпидемические периоды с 2018 по 2021 гг., с преобладанием ВГ А/Н1N1(sw2009), в 2020-2021 гг. циркуляция ВГ А/Н3N2 не выявлена. В исследуемый период у свинопоголовья не обнаружены ВГ(А) субтипов Н5, Н7 и Н9.

3.3 Серологический анализ сывороток крови

Результаты серологического исследования в РТГА 89 сывороток крови, собранных от свиней в Костанайской области в 2018 г. и 2021 г. [217], с референсными штаммами, представлены на рисунке 19. В качестве эталонных

вариантов использовали ВГ(А) свиней A/swine/Iowa/15/30 (H_{sw}1N1), пандемический вариант ВГ(А) - A/California/04/09 (A/H1N1pdm) и ВГ(А) с антигенной формулой Н3N2 - A/Panama/2007/99. Также сыворотки крови проверяли на наличие антител к ВГ Н5, Н7 и Н9. С этой целью использовали диагностикумы, приобретенные из коллекции ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

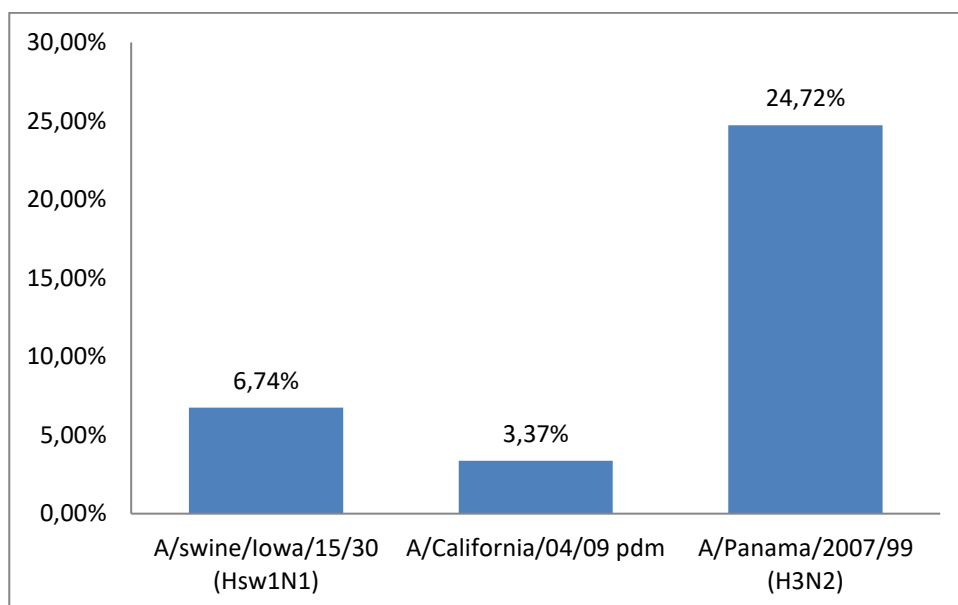


Рисунок 19 – Результаты серологического анализа сывороток крови свиней в РТГА

Установлено, что шесть проб (6,74% от общего количества исследованных сывороток) оказались положительными к ВГ A/swine/Iowa/15/30 (H_{sw}1N1), титр составил 1:40. В трех сыворотках крови животных (3,37%) антигемагглютинины выявлены к ВГ A/California/04/09 (A/H1N1pdm). Наибольшее количество сывороток 22 (24,72%) крови оказались позитивными к вирусу A/Panama/2007/99 (H3N2). Титры антител регистрировались от 1:80 до 1:320. С диагностическими ВГ Н5, Н7 и Н9 получены отрицательные результаты.

Таким образом, серологическое исследование 89 сывороток крови в РТГА подтвердило социркуляцию в популяции свиней Костанайской области в 2018 г. и 2021 г. ВГ A/H1N1 и A/H3N2.

3.4 Изоляция и идентификация гемагглютинирующих агентов

С целью изоляции ВГС провели первичное заражение и ряд последовательных пассажей на КК MDCK и КЭ 116 ПЦР-положительных проб.

Из носоглоточных смывов, собранных в свинокомплексах Алматинской, Павлодарской и Северо-Казахстанской областей, выделены 12 ГАА с титрами ГА на КК MDCK 1:4 – 1:32 и на КЭ – 1:32 – 1:1024. Для дальнейших

исследований отобраны шесть ГАА с титрами ГА на КЭ 1: 512 – 1: 1024. Антигенную формулу выделенных агентов устанавливали в РТГА и РИНА.

В таблице 6 представлены результаты определения подтипов НА казахстанских изолятов ВГС 2018-2019 гг. в РТГА. Для постановки РТГА использовали три диагностические сыворотки к ВГ (А) и ВГ(В) производства ООО «ППДП», (г. Санкт-Петербург, Россия), и семь кроличьих сывороток, полученных к референсным штаммам ВГ(А) подтипов H1N1, H1N1 pdm, Hsw1N1 и H3N2 ранее и хранящихся в лаборатории биохимии вирусов.

Таблица 6 – Результаты идентификации подтипов гемагглютинаина казахстанских изолятов вируса гриппа, выделенных от свиней в 2018-2019 гг., в реакции торможения гемагглютинации

Имунная сыворотка к референсным штаммам	Титры антигемагглютининов к изолятам						
	Гомологичные титры	А/свинья/Алматы/45/19	А/свинья/Павлодар/44/19	А/свинья/Павлодар/43/19	А/свинья/Петропавловск/03/18	А/свинья/Петропавловск/02/18	А/свинья/Петропавловск/01/18
B/Colorado/06/2017	160	<20	<20	<20	<20	<20	<20
A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm	160	<20	40	80	<20	<20	<20
A/California/07/09 (H1N1) pdm	160	<20	<20	<20	<20	<20	<20
A/Singapore/INFIMN-16-0019/2016 (H3N2)	160	40	<20	<20	<20	<20	<20
A/Perth/16/09 (H3N2)	640	80	<20	<20	<20	<20	<20
A/Wisconsin /67/05 (H3N2)	320	40	<20	<20	<20	<20	<20
A/Panama/2007/99 (H3N2)	640	80	<20	<20	<20	<20	<20
A/NewJersey/8/76 (H1N1)	640	<20	80	40	40	80	40
A/USA/1976/31 (Hsw1N1)	1280	<20	160	160	80	160	160
A/swine/Iowa/15/30 (Hsw1N1)	640	<20	80	80	160	80	80
Примечание - даны обратные величины титров специфических антигемагглютининов.							

Как видно из таблицы 6, ГА североказахстанских изолятов (01/18; 02/18; 03/18; 44/19 и 43/19) в титрах от 1:40 до 1:160 подавлялась диагностической сывороткой к эталонному вирусу A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm и иммунными сыворотками к референсным вариантам A/NewJersey/8/76 (H1N1), A/USA/1976/31 (Hsw1N1) и A/swine/Iowa/15/30 (Hsw1N1). С диагностическими сыворотками к референсным штаммам ВГ A/Singapore/INFIMN-16-0019/2016 (H3N2) и B/Colorado/06/2017, а также с иммунными сыворотками к эталонным вирусам A/H3N2 A/Perth/16/09, A/Wisconsin /67/05 и A/Panama/2007/99 получены отрицательные результаты. ГА алматинского изолята 45/19 в титрах

1:40 – 1:80 ингибировалась диагностической и иммунными сыворотками с антигенной формулой А/Н3N2 (А/Singapore/INFIMN-16-0019/2016, А/Perth/16/09, А/Wisconsin /67/05 и А/Panama/2007/99). С гетерологичными сыворотками изолят 45/19 не взаимодействовал.

Таким образом, в РТГА установлено, что ГАА, выделенные от свиней в 2018-2019 гг., принадлежат к ВГ(А) с подтипами НА Н1 и Н3.

В таблице 7 представлены результаты идентификации подтипов НА казахстанских штаммов ВГС 2018-2019 гг. с иммунными поликлональными сыворотками к ВГ А/ Н1N1 и А/Н3N2 в РИНА.

Таблица 7 – Идентификация подтипов нейраминидазы казахстанских изолятов вируса гриппа свиней 2018-2019 гг. в реакции ингибции нейраминидазной активности

Изолят	Титр антинейраминидазных антител с иммунными сыворотками к вирусам	
	Н1N1	Н3N2
А/свинья/Алматы/45/19	< 20	100
А/свинья/Павлодар/44/19	100	< 20
А/свинья/Павлодар/43/19	100	< 20
А/свинья/Петропавловск/03/18	100	< 20
А/свинья/Петропавловск/02/18	100	< 20
А/свинья/Петропавловск/01/18	100	< 20
Примечание - даны обратные величины титров специфических антинейраминидазных антител.		

Установлено, что нейраминидазная активность пяти североказахстанских изолятов (44/19; 43/19; 03/18; 02/18 и 01/18) в титрах 1:100 подавлялась иммунной поликлональной сывороткой к ВГ(А) с антигенной формулой Н1N1. Вместе с тем ферментативная активность алматинского изолята 45/19 ингибировалась поликлональной сывороткой к А/Н3N2.

Следовательно, по данным РИНА три петропавловских (01/18; 02/18 и 03/18) и два павлодарских изолята (44/19 и 43/19) отнесены к ВГ(А) с подтипом НА N1, а алматинский изолят 45/19 идентифицирован как ВГ(А) с подтипом НА N2.

Таким образом, изоляты А/свинья/Петропавловск/03/18 [218], А/свинья/Петропавловск/02/18 и А/свинья/Петропавловск/01/18, А/свинья/Павлодар/44/19 и А/свинья/Павлодар/43/19 идентифицированы в РТГА и РИНА как ВГ с антигенной формулой А/Н1N1, а изолят А/свинья/Алматы/45/19 как ВГ А/Н3N2.

3.5 Эволюционно-филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей казахстанских штаммов вируса гриппа свиней

3.5.1 Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов штаммов вируса гриппа свиней

Чтобы подобрать гены для секвенирования, проведен анализ консервативности всех восьми генов ВГ. С этой целью в международной базе данных NCBI были скачены последовательности восьми генов 10000 последовательностей. Последовательности попарно выравнивались в рамках каждого гена используя программное обеспечение MEGA X. После выравнивания последовательностей проводилась оценка доли консервативных и вариабельных участков в каждом гене (таблица 8).

Таблица 8 - Доля консервативных и вариабельных участков восьми генов вируса гриппа

Гены	Общее количество нуклеотидов	Количество вариабельных участков	Доля вариабельных участков в %
HA	1704	1121	65,79
NA	1882	1608	85,44
NS	851	615	72,27
M	988	531	53,74
NP	1507	885	58,73
PA	2153	1288	59,82
PB1	2356	1226	52,04
PB2	2409	1359	56,41

Анализ полученных данных выявил, что наибольшей вариабельностью обладают гены NA, HA и NS. Меньшим эволюционным потенциалом обладали коровые гены. С точки зрения эволюции, такое различие вполне объяснимо, так как позволяет вирусам достаточно быстро подстраиваться под меняющиеся условия обитания. С целью оценки эволюционных взаимоотношений казахстанских ВГС, исследуемых в рамках данной работы, проведено секвенирование наиболее вариабельных генов ВГ. Ввиду того, что устойчивость ко многим терапевтическим препаратам обусловлена мутациями в М белке, ген кодирующий данный белок также был выбран для секвенирования.

Проведено секвенирование четырех генов, кодирующих белки ВГ: HA, NA, NS и М трех петропавловских штаммов (А/свинья/Петропавловск/03/18, А/свинья/Петропавловск/02/18 и А/свинья/Петропавловск/01/18,) и одного изолята выделенного в Павлодаре (А/свинья/Павлодар/43/19). Для изолята А/свинья/Павлодар/44/19 удалось получить нуклеотидные последовательности трех генов – HA, NS и М и два гена NS и М – для изолята А/свинья/Алматы/45/19.

Кроме того выполнено полногеномное секвенирование двух ПЦР-положительных образцов (А/свинья/Караганда/03/20 и А/свинья/Караганда/04/20), собранных от свиней в Карагандинской области в 2020 г.

В ходе секвенирования генов казахстанских штаммов ВГ получены риды – фрагменты ДНК. Качество полученных ридов определяли с помощью программы fastQC. На протяжении большей части длины ридов качество секвенирования оставалось стабильным во всех образцах. Среднестатистические значения качества ридов были выше 20 единиц по Phred Score. Анализ нуклеотидного состава по позициям в риде показал в среднем равномерное распределение независимо от локализации в сиквенсе, за исключением первых 10-20 нуклеотидов и последних 100 нуклеотидов. После оценки качества ридов, был проведен тримминг сиквенсов с использованием инструментов, имплементированных в пакетах программ Unipro UGENE v44.0 и DNASTar v.17.3.0.57. Были удалены участки неприемлемого качества. После проведенной оптимизации качество полученных ридов соответствовало Q25 – Q30.

Сборку нормализованных ридов проводили *de novo*. Полученные консенсусные последовательности выравнивали на соответствующий референс-геном взятый из международной базы данных NCBI.

Нуклеотидные последовательности всех генов ВГС А/свинья/Караганда/03/20 и А/свинья/Караганда/04/20 разместили в международной базе данных NCBI под номерами доступа по каждому сегменту, указанными в таблице 9 [219].

Таблица 9 - Номера доступа генов вируса гриппа свиней А(H1N1) А/свинья/Караганда/03/2020 и А/свинья/Караганда/04/2020 в международной базе данных GenBank

Сегменты генома	Название штамма	
	А/свинья/Караганда/03/2020	А/свинья/Караганда/04/2020
PB2	MZ396822.1	MZ363969.1
PB1	-*	MZ363970.1
PA	MZ396823.1	MZ363971.1
HA	MZ396824.1	MZ363972.1
NP	MZ396825.1	MZ363973.1
NA	MZ396826.1	MZ363974.1
M	MZ396827.1	MZ363975.1
NS	MZ396828.1	MZ363976.1
Примечание - *по гену PB1 для штамма А/свинья/Караганда/03/2020(H1N1) нуклеотидные последовательности не получены; доступ к считыванию необработанных последовательностей можно получить через базу данных «Архива считывания последовательностей» (SRA) под номерами биопроектов PRJNA742842 и SRR15011445.		

3.5.2 Филогенетический анализ генов казахстанских штаммов вируса гриппа свиней

Проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых казахстанских вариантов ВГС для выявления отличительных

особенностей и эволюционных взаимосвязей между изолированными штаммами и ВГ, циркулирующими в мире.

С целью предварительного анализа генетической гетерогенности и определения степени родства между исследуемыми изолятами, были получены таблицы оценки идентичности и построены филогенетические деревья по НА, NA, NS и М генам (таблицы 10 – 13 и рисунки 20 – 23). В таблицах оценки эволюционной дивергенции между последовательностями справа синим цветом показано подобие между штаммами в процентном отношении, слева красным приведено долевое соотношение замен оснований на сайт. Вариации скорости между сайтами моделировались с помощью гамма-распределения. В анализ были включены позиции кодонов: 1-й+2-й+3-й+некодирующие. Для каждой пары последовательностей были удалены все неоднозначные позиции. Анализируя данные, приведенные в таблицах, и топологию полученных деревьев, было высказано предположение о том, что казахстанские варианты формируют два больших независимых кластера.

Таблица 10 - Оценка степени родства между казахстанскими вариантами по гену НА

		A	B	C	D	E	F	G
A	Karaganda_03_20		100,00	48,18	51,82	80,00	80,00	80,00
B	Karaganda_04_2020	0,00		48,18	51,82	80,00	80,00	80,00
C	Pavlodar_43_19	0,52	0,52		66,36	46,36	46,36	46,36
D	Pavlodar_44_19	0,48	0,48	0,34		51,82	51,82	51,82
E	Petropavlovsk_1_2018	0,20	0,20	0,54	0,48		100,00	100,00
F	Petropavlovsk_2_2018	0,20	0,20	0,54	0,48	0,00		100,00
G	Petropavlovsk_3_2018	0,20	0,20	0,54	0,48	0,00	0,00	

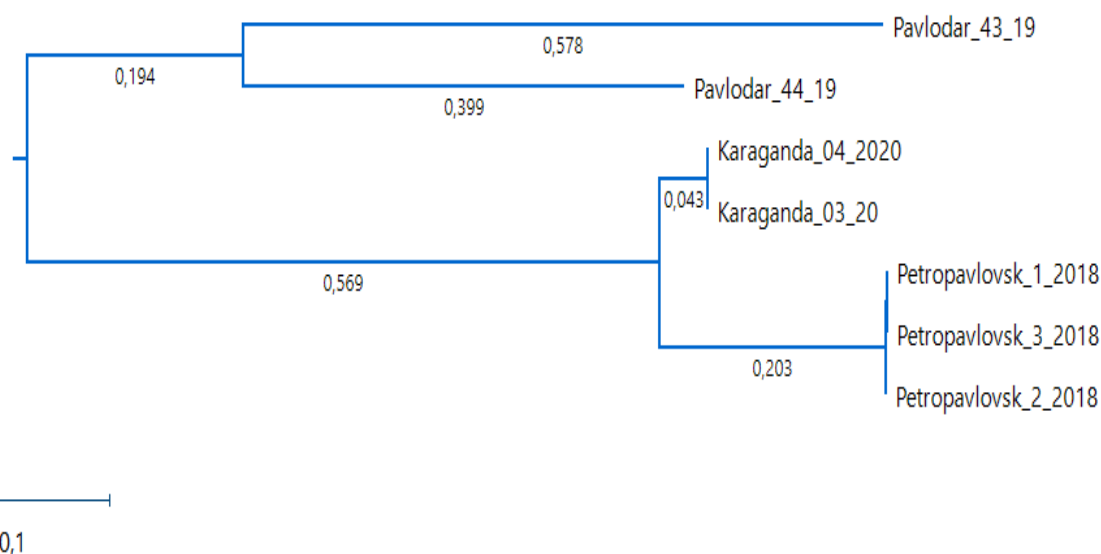


Рисунок 20 - Филогенетическое дерево отражающее родственные взаимоотношения среди казахстанских штаммов по НА гену (ML)

Таблица 11 – Оценка степени родства между казахстанскими вариантами по гену NA

		A	B	C	D	E	F
A	Karaganda_03_20_NA		100,00	83,16	83,00	82,77	81,10
B	Karaganda_04_20_NA	0,00		83,16	83,00	82,77	81,10
C	Pavlodar_43_19_NA	0,17	0,17		96,80	96,57	96,27
D	Petropavlovsk_1_2018_NA	0,17	0,17	0,03		98,17	95,05
E	Petropavlovsk_3_2018_NA	0,17	0,17	0,03	0,02		95,12
F	Petropavlovsk_2_2018_NA	0,19	0,19	0,04	0,05	0,05	

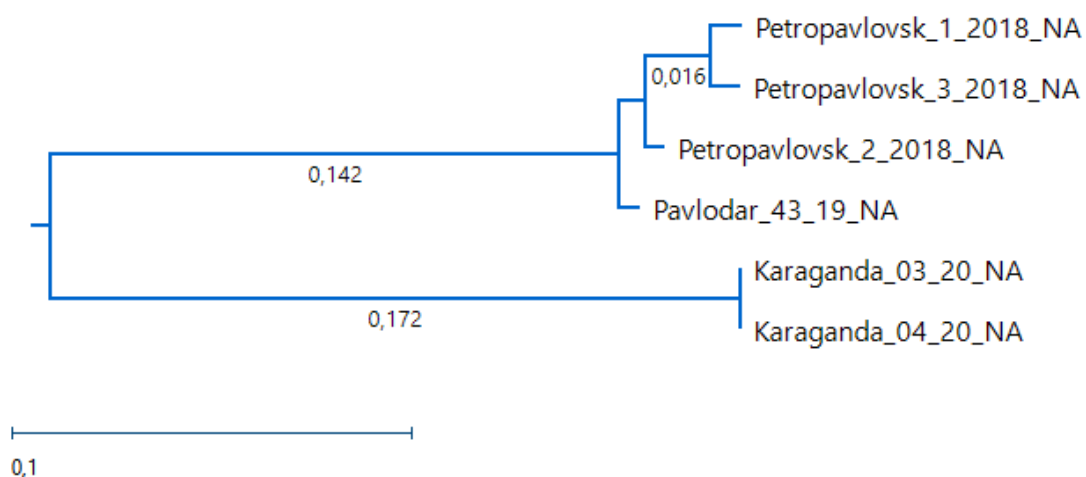


Рисунок 21 – Филогенетическое дерево, отражающее родственные взаимоотношения среди казахстанских штаммов по НА гену (ML)

Таблица 12 – Оценка степени родства между казахстанскими вариантами по гену NS

		A	B	C	D	E	F	G	H
A	Almaty_45_19_NS		84,13	84,13	92,40	99,43	91,95	91,84	92,18
B	Karaganda_03_20_NS	0,16		100,00	86,39	84,35	86,85	86,96	86,51
C	Karaganda_04_20_NS	0,16	0,00		86,39	84,35	86,85	86,96	86,51
D	Pavlodar_43_19_NS	0,08	0,14	0,14		92,06	99,55	99,43	99,55
E	Pavlodar_44_19_NS	0,01	0,16	0,16	0,08		92,18	92,06	92,18
F	Petropavlovsk_1_2018_NS	0,08	0,13	0,13	0,00	0,08		99,89	99,66
G	Petropavlovsk_2_2018_NS	0,08	0,13	0,13	0,01	0,08	0,00		99,55
H	Petropavlovsk_3_2018_NS	0,08	0,13	0,13	0,00	0,08	0,00	0,00	

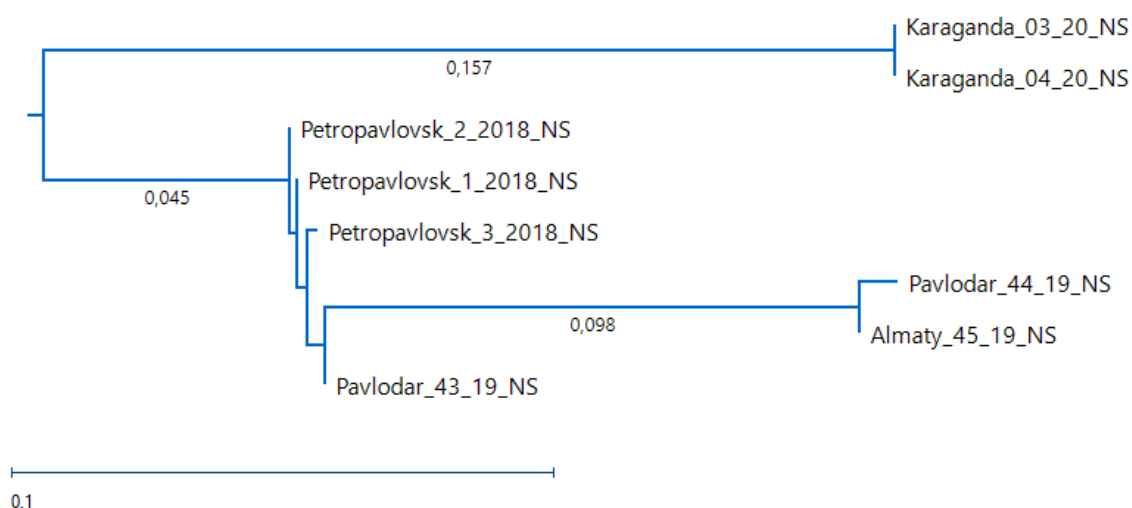


Рисунок 22 – Филогенетическое дерево, отражающее родственные взаимоотношения среди казахстанских штаммов по NS гену (ML)

Таблица 13 – Оценка степени родства между казахстанскими вариантами по гену M

	A	B	C	D	E	F	G	H
A Almaty_45_19_M		90,16	90,16	89,67	41,57	89,67	89,67	89,67
B Karaganda_03_20_M	0,10		100,00	87,70	40,96	87,70	87,70	87,70
C Karaganda_04_2020_M	0,10	0,00		87,70	40,96	87,70	87,70	87,70
D Pavlodar_43_19_M	0,10	0,12	0,12		41,45	100,00	100,00	100,00
E Pavlodar_44_19_M	0,58	0,59	0,59	0,59		41,45	41,45	41,45
F Petropavlovsk_1_2018_M	0,10	0,12	0,12	0,00	0,59		100,00	100,00
G Petropavlovsk_2_2018_M	0,10	0,12	0,12	0,00	0,59	0,00		100,00
H Petropavlovsk_3_2018_M	0,10	0,12	0,12	0,00	0,59	0,00	0,00	

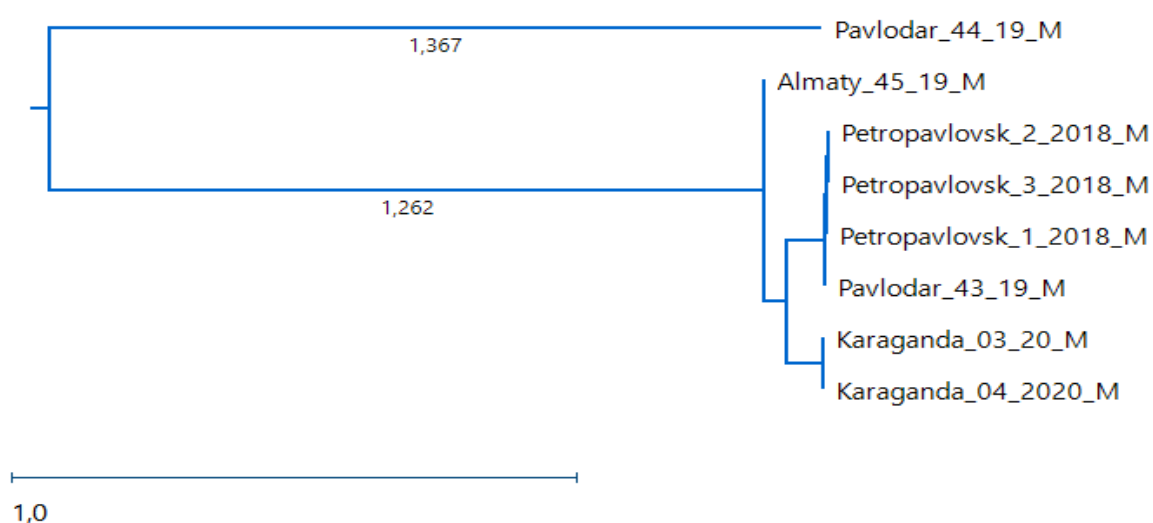


Рисунок 23 – Филогенетическое дерево, отражающее родственные взаимоотношения среди казахстанских штаммов по M гену (ML)

С целью установления эволюционных взаимосвязей и уточнения источников происхождения казахстанских штаммов ВГ проведен филогенетический анализ путем сравнения нуклеотидных последовательностей выбранных генов с референсными последовательностями. Референсные последовательности были взяты из информационной системы BV-BRC (Ресурсный центр бактериальной и вирусной биоинформатики), в которой объединены данные и технологии двух ресурсов: PATRICK – бактериальная система, и IRD /ViPR – вирусная система (<https://www.bv-brc.org/>).

В базе данных BV-BRC проведен поиск референсных геномов исходя из следующих критериев оценки:

- полногеномная последовательность;
- географический регион Европа и Азия.

Были получены, в среднем по 1000 нуклеотидных последовательностей каждого из исследуемых генов - HA, NA, NS и M.

Используя алгоритм MUSCLE имплементированный в программное обеспечение MEGA X, проведено множественное выравнивание референсных нуклеотидных последовательностей и последовательностей казахстанских штаммов. Так же используя программное обеспечение MEGA X, проведен поиск более оптимального метода построения филогенетического дерева для каждого набора генов (таблица 14).

Этот подход позволяет проверить набор данных на пригодность к некоторым популярным моделям эволюции и возвращает значения нескольких критериев, которые могут быть использованы для выбора наиболее подходящей эволюционной модели. Результаты представлены в виде оценочных значений всех параметров для каждой модели (частоты, вероятности перехода, параметры изменения скорости и т.д.), а также подсчет общих параметров. Модели с наименьшими BIC баллами (Байесовский информационный критерий) считаются наиболее подходящими для описания эволюционных связей.

На основании проведенного анализа были выбраны модели для построения филогенетических деревьев, для каждого набора нуклеотидных последовательностей исследуемых генов.

Таблица 14 – Расчет Байесовского информационного критерия для различных эволюционных моделей

Модель	Значение ВИС			
	НА ген	NA ген	NS ген	М ген
GTR	275023,904	199 358,06	97 014,02	90 344,42
GTR+G	259088,414	187 768,45	92 358,84	84 516,35
GTR+G+I	259 023,309	187 713,47	92 342,45	84 517,52
GTR+I	271226,288	195 512,93	94 727,49	88 243,57
HKY	275737,12	200 226,89	97 149,26	90 370,89
HKY+G	259553,408	188 175,02	92 463,12	84 554,91
HKY+G+I	259504,327	188 131,30	92 454,48	84 559,64
HKY+I	271860,234	196 181,77	94 823,35	88 268,91
JC	290355,284	212 136,74	102 482,49	94 854,75
JC+G	275668,807	201 122,96	97 803,25	89 182,16
JC+G+I	275594,062	201 094,21	97 786,82	89 183,95
JC+I	286743,641	208 381,07	100 174,31	92 835,92
K2	276851,722	200 670,38	97 654,26	90 420,17
K2+G	261001,692	188 910,11	92 888,26	84 609,30
K2+G+I	260947,619	188 876,53	92 872,46	84 608,65
K2+I	273101,956	196 731,80	95 307,74	88 316,80
T92	275678,042	199 969,60	97 285,21	90 356,45
T92+G	259798,663	188 075,88	92 599,89	84 556,23
T92+G+I	259735,414	188 037,43	92 592,70	84 557,42
T92+I	271929,659	195 954,54	94 970,16	88 249,48
TN93	275587,789	199 892,50	97 155,03	90 378,49
TN93+G	259496,133	188 168,83	92 462,37	84 565,50
TN93+G+I	259443,124	188 129,66	92 452,39	84 571,73
Примечания: 1 GTR – General Time Reversible; 2 HKY – Hasegawa-Kishino-Yano; 3 JC – Jukes-Canto; 4 K2 – Kimura 2-parameter; 5 T92 – Tamura 3-parameter4 6 TN93 - Tamura-Nei; 7 (+G) - Gamma distribution - гамма-распределение; 8 (+I) - evolutionarily invariable - доля неизменных сайтов.				

С целью предварительного анализа генетической гетерогенности и определения степени родства между исследуемыми изолятами, были построены филогенетические деревья по четырем генам: НА, NA, NS и М (рисунки 24 - 27).



Рисунок 24 – Филогенетическое дерево по НА гену

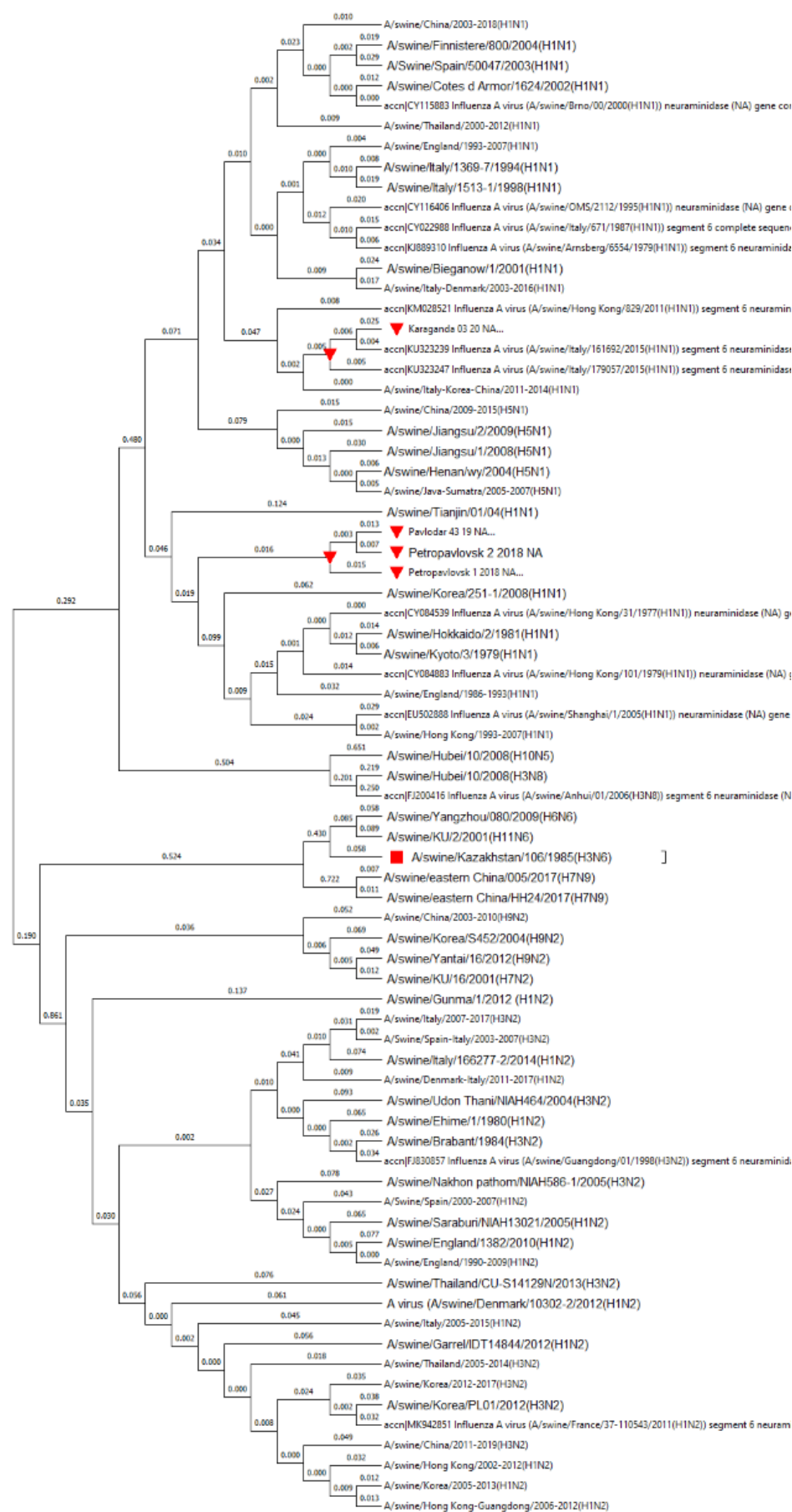


Рисунок 25 – Филогенетическое дерево по NA гену

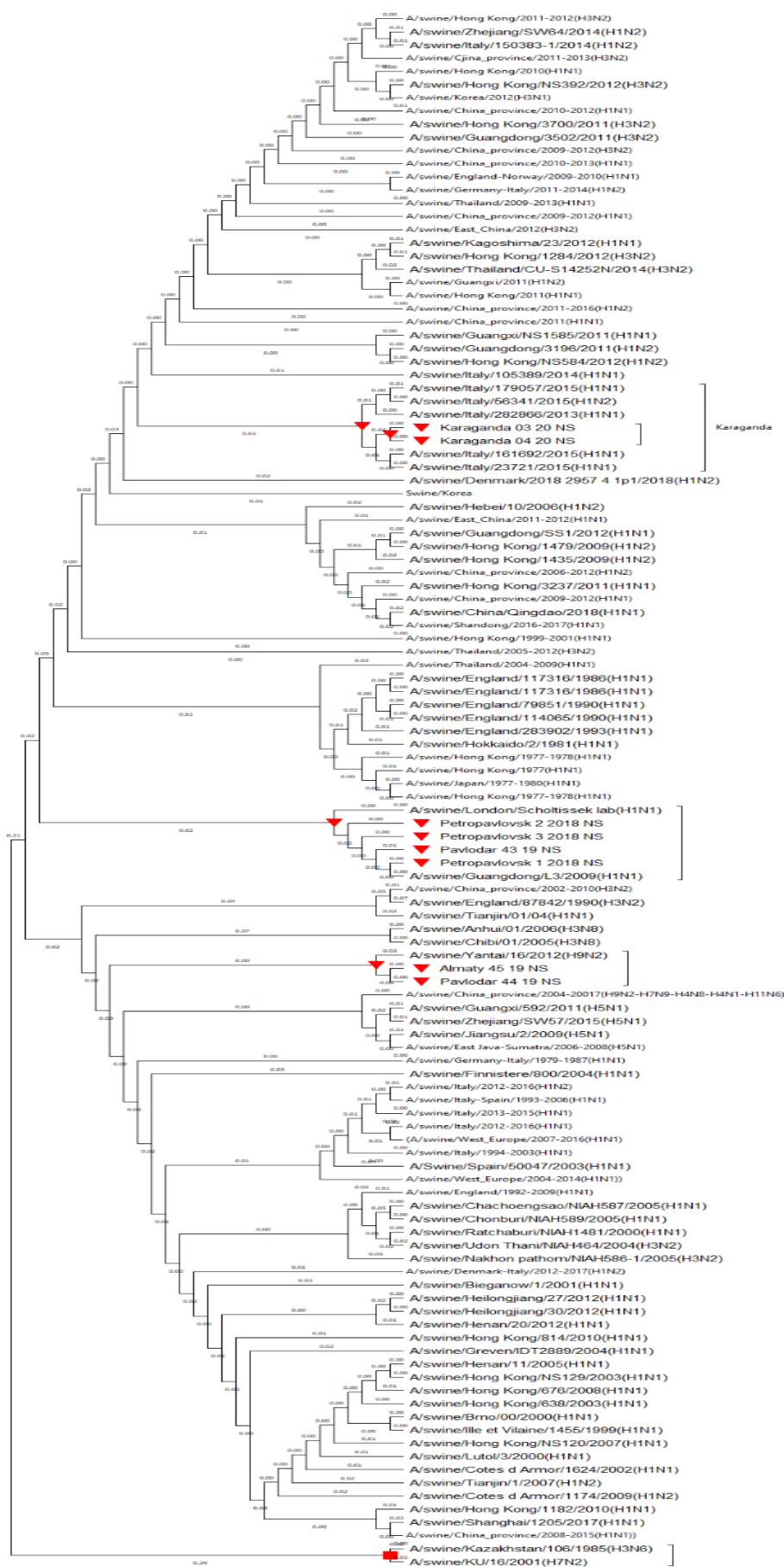


Рисунок 26 – Филогенетическое дерево по NS гену

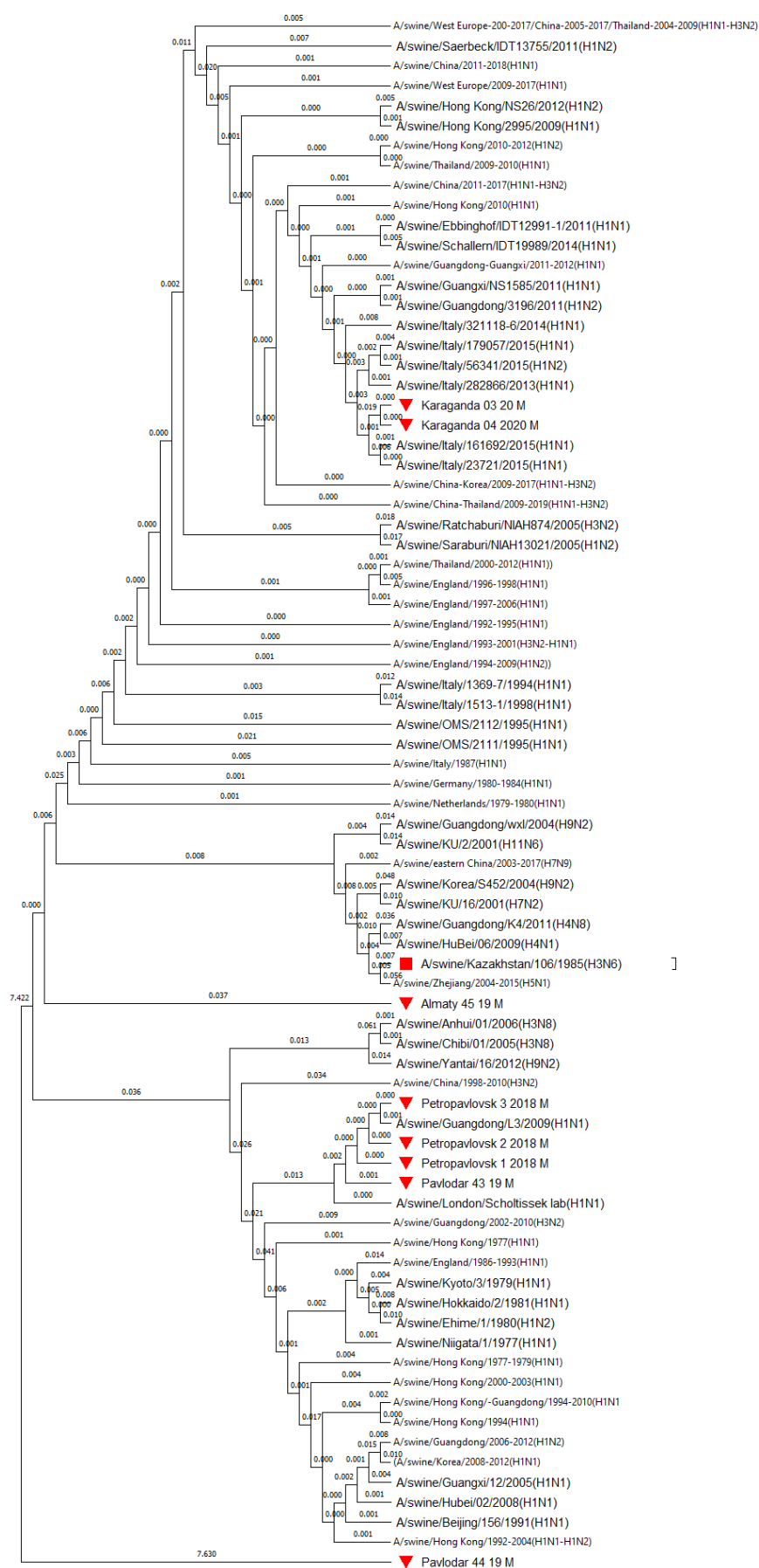


Рисунок 27 – Филогенетическое дерево по М гену

Из рисунков 24 - 26 следует, что по генам HA, NA и NS карагандинские ВГС (03/2020 и 04/2020) формируют монофилетичную ветвь со штаммами, выделенными в 2015 г в Италии. В то время петропавловские штаммы (01/2018, 02/2018 и 03/2018) по генам HA, NA и NS и павлодарский изолят (43/2019) по генам NA и NS находились на ветви филогенетического древа объединившей штаммы, выделенные в Китае (A/swine/Guangdong/L3/2009(H1N1), Корею и Японии. Для сравнения по генам NS, был добавлен изолят A/swine/Kazakhstan/106/1985. Данный штамм, как и в случае с NS геном, сформировал отдельную филогенетическую группу и выступал в качестве внешней группы и со штаммом, полученным в 2001 г. A/swine/KU/16/2001. Тем самым показывая, что эволюция в пределах одного региона происходит по-разному.

Штаммы A/свинья/Караганда/03/2020 и A/свинья/Караганда/04/2020 по гену NS формируют монофилетичную ветвь вместе с изолятами полученными в 2015 году в Италии. Штаммы A/свинья/Алматы/45/19 и A/свинья/Павлодар/44/19 формируют ветвь совместно со штаммом A/swine/Yantai/16/2012(H9N2) выделенным в Китае. Примечательно что штамм A/свинья/Павлодар/43/19 по NS гену оказался на одной монофилетичной ветви совместно со штаммами выделенными в Петропавловске в 2018 г. Все три штамма, выделенные в Петропавловске, оказались близкородственны штаммам A/swine/London/Scholtissek lab(H1N1) и A/swine/Guangdong/L3/2009(H1N1). В качестве внешней группы выступили штамм A/swine/Kazakhstan/106/1985, выделенный в 1985 году и штамм полученный в 2001 г. A/swine/KU/16/2001.

Анализ филогенетических отношений казахстанских изолятов по гену NA, показал что штаммы выделенные в Караганде формируют монофилетичную ветвь со штаммами выделенными в 2015 г в Италии. В целом, генетическая ветвь к которой были отнесены Карагандинские штаммы, содержала изоляты преимущественно полученные в западной Европе. Примечательно, что штаммы выделенные в Петропавловске и в Павлодаре, находились на ветви филогенетического древа объединившей штаммы выделенные в Китае, Корею и Японии. Для сравнительного анализа, как и для гена NS, был добавлен изолят A/swine/Kazakhstan/106/1985. Данный штамм, как и в случае с NS геном, сформировал отдельную филогенетическую группу. Тем самым показывая, что эволюция в пределах одного региона происходит по-разному.

Изучение распределения казахстанских штаммов на филогенетическом древе по гену M, выявило ряд интересных особенностей. С одной стороны, карагандинские штаммы, как и в случае с анализом по NA гену, формировали монофилетичную ветвь со штаммами, выделенными в Италии. Штаммы полученные в Петропавловске штамм A/свинья/Павлодар/43/19 формировали генетическую ветвь совместно со штаммами A/swine/London/Scholtissek lab(H1N1) и A/swine/Guangdong/L3/2009(H1N1). С другой стороны, штамм A/свинья/Алматы/45/19, формально, находился с

карагандинскими штаммами на одной генетической ветви построенного дерева. Однако, имел достаточное количество мутаций в М гене, которое позволило занять обособленное место внутри ветви. Аналогичная ситуация наблюдалась и для штамма А/свинья/Павлодар/44/19. Топология дерева, указывает, что штамм А/свинья/Павлодар/44/19 в значительной мере отличается от других изолятов, что позволяет ему занять обособленное местоположение на филограмме. Т.е. количество мутации в М гене данного штамма настолько было велико, что отделило штамм А/свинья/Павлодар/44/19 от всех используемых штаммов. Ввиду того что данный штамм был выделен в 2019 году, одновременно со штаммами А/свинья/Павлодар/43/19 и А/свинья/Алматы/45/19, версия о лавинообразном накоплении мутаций представляется маловероятной. Данный факт наталкивает на мысль о возможной реассортации по М гену штамма А/свинья/Павлодар/44/19.

Анализ топологии дерева по гену НА в очередной раз подтвердил генетическое родство штаммов выделенных в Петропавловске со штаммами А/swine/London/Scholtissek lab(H1N1) и А/swine/Guangdong/L3/2009(H1N1). Карагандинские штаммы, также образовывали ветвь со штаммами выделенными в Италии. Однако, как и в случае с распределением по М гену, была выявлена особенность. Оба штамма выделенные в Павлодаре, выступили своеобразными внешними группами для используемого набора нуклеотидных последовательностей.

На основании проведенного общего филогенетического анализа прослеживается четкая закономерность связывающая происхождение карагандинских штаммов со штаммами, выделенными в Италии. Общность генетических маркеров по всем анализируемым генам, а также анализ годов выделения, позволяет предположить, что на территорию РК произошел занос вариантов вируса гриппа с территории Европы.

Интересным фактом стало то, что штаммы выделенные в Павлодаре достаточно сильно отличались по М и НА генам от используемого набора нуклеотидных последовательностей. Как было отмечено, подобные различия могут быть причиной реассортационных процессов, или ошибкой секвенирования.

3.5.3 Мутации в генах казахстанских штаммов вируса гриппа свиней

В дальнейших исследованиях проведен поиск мутаций в исследуемых генах. Для проведения исследований использовался текущий набор последовательностей нуклеотидов для каждого гена состоящий из 1024 нуклеотидных последовательностей. Используя программное обеспечение DNASTAR определен перечень мутаций по каждому гену (таблицы 15 – 18).

Таблица 15 – Поиск однонуклеотидных полиморфизмов в НА гене.

Штамм, изолят	Позиция нуклеотида	Аминокислота	Замена аминокислоты	Классификация замены	Тип
1	2	3	4	5	6
Karaganda_03_20_HA	59	G>A	p.T13A	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	69	A>G	p.K16N	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	80	A>T	p.T26A	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	108	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	176	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	182	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	200	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	275	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	305	A>C	p.R91S	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	334	A>G	p.N101S	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	372	A>G	p.N114D	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	428	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	455	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	495	T>C	p.Y155H	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	497	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	524	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	527	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	536	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	568	A>G	p.N179S	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	570	C>A	p.Q180K	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	573	A>T	p.T181S	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	611	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	637	C>G	p.T202S	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	730	C>T	p.T233I	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	791	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	849	A>G	p.T273A	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	898	C>T	p.A289V	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	911	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	930	G>A	p.E300K	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	966	G>A	p.V312I	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	986	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	998	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1073	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1112	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1175	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1190	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1202	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1262	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1283	T>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1298	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1302	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1329	A>C	p.M433L	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	1352	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1368	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1370	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1394	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1418	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1427	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1505	A>G		Change, intergenic	SNP

продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5	6
Karaganda_03_20_HA	1523	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1578	A>G	p.K516E	Non-synonymous	SNP
Karaganda_03_20_HA	1589	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1613	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_HA	1685	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_04_20_HA	59	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	69	A>G	p.T13A	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	80	A>T	p.K16N	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	108	A>G	p.T26A	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	176	T>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	182	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	200	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	275	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	305	A>C	p.R91S	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	334	A>G	p.N101S	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	372	A>G	p.N114D	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	428	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	455	T>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	495	T>C	p.Y155H	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	497	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	524	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	527	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	536	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	568	A>G	p.N179S	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	570	C>A	p.Q180K	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	573	A>T	p.T181S	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	611	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	637	C>G	p.T202S	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	730	C>T	p.T233I	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	791	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	849	A>G	p.T273A	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	898	C>T	p.A289V	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	911	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	930	G>A	p.E300K	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	966	G>A	p.V312I	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	986	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	998	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1073	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1112	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1175	T>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1190	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1202	T>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1262	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1283	T>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1298	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1302	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1329	A>C	p.M433L	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1352	A>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1368	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1370	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_HA	1394	T>C	p.(=)	Synonymous	SNP

продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5	6
Karaganda_04_20_NA	1418	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1427	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1505	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1523	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1578	A>G	p.K516E	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1589	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1613	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1685	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP

Проведенный анализ выявил по 54 мутации в гене НА у двух карагандинских ВГС (03/20 и 04/20). Причем 18 из них были несинонимичными, т.е. мутация приводила к смене аминокислоты. Для определения характера аминокислотных замен использовали таблицу физико-химических дистанций Р. Грентсема [188], учитывающую три параметра взаимозаменяемых аминокислотных остатков: полярность, объем и состав, определяемый как соотношение атомных масс неуглеродных атомов, входящих в концевые группы или кольца, к атомным массам углеродов боковых радикалов. При значении физико-химической дистанции большем 57,9 замена считается консервативной, в обратном случае – радикальной [220]. Из приведенных данных только мутации K16N и R91S носят радикальный характер и согласно матрице физико-химических дистанций имеют значения 54 и 50 соответственно. Это в свою очередь может указывать на то, что смена аминокислот по данным положениям может существенно влиять на биологическую активность белка НА карагандинских ВГС (03/20 и 04/20). Для остальных казахстанских штаммов ВГС не было выявлено существенных мутаций.

В дальнейшем проводился анализ мутаций по НА гену (таблица 16).

Таблица 16 – Поиск однонуклеотидных полиморфизмов в НА гене.

Штамм, изолят	Позиция нуклеотида	Аминокислота	Замена аминокислоты	Классификация замены	Тип
1	2	3	4	5	6
Karaganda_03_20_NA	53	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	116	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	134	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	138	AA>GG		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	147	GC>AT		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	202	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	245	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	271	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	332	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	391	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	393	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	396	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	406	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	430	T>C		Change, intergenic	SNP

продолжение таблицы 16

1	2	3	4	5	6
Karaganda_03_20_NA	466	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	472	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	502	A>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	550	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	579	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	595	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	615	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	619	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	632	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	637	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	643	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	676	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	703	A>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	706	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	736	CA>TG		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	769	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	778	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	806	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	824	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	826	A>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	856	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	862	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	953	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	958	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	961	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	977	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	1105	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	1123	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	1150	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	1165	T>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	1174	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	1219	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	1243	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	1297	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	1303	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NA	1361	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_04_20_NA	57	A>G	p.I13V	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	120	G>A	p.V34I	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	138	A>C	p.I40L	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	142	AA>GG	p.E41G	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	151	GC>AT	p.S44N	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	206	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	249	A>G	p.R77G	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	275	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	336	G>A	p.V106I	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	395	T>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	397	T>C	p.L126P	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	400	C>T	p.S127L	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	410	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP

продолжение таблицы 16

1	2	3	4	5	6
Karaganda_04_20_NA	434	T>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	470	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	476	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	506	A>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	554	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	583	C>T	p.T188I	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	599	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	619	G>A	p.S200N	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	623	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	636	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	641	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	647	T>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	680	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	707	A>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	710	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	740	CA>TG	p.I241V	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	773	T>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	782	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	810	A>G	p.I264V	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	828	G>A	p.E270K	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	830	A>T	p.E270D	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	860	T>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	866	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	957	A>C	p.K313Q	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	962	G>A	p.M314I	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	965	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	981	G>A	p.V321I	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1109	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1127	A>C	p.K369N	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1154	T>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1169	T>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1178	A>C	p.K386N	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1223	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1247	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1301	A>C	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1307	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NA	1365	G>A	p.D449N	Non-synonymous	SNP

В ходе анализа обнаружено по 50 мутаций у ВГС А/свинья/Караганда/03/20 и А/свинья/Караганда/04/20. Из этого количества мутаций у штамма А/свинья/Караганда/04/20, 21 мутация носила несинонимический характер и только 2 мутации относились к несинонимичным у ВГС А/свинья/Караганда/03/20. Обе мутации штамма А/свинья/Караганда/03/20 по положениям 140 и 200 (I40L и S200N) носили консервативный характер и, предположительно, незначительно влияют на биохимические свойства НА. Совершенно другая картина наблюдалась у штамма А/свинья/Караганда/04/20. Из 21 несинонимичной мутации 6 мутаций согласно таблице физико-химических дистанций Грентсема,

носили радикальный характер. Замены регистрировались в положениях E41G, R77G, L126P, S127L, K369N и K386N гена NA.

В 41 позиции возникла двухшаговая мутация (AA>GG) приведшая к смене аминокислоты глутаминовая кислота (Glu) на глицин (Gly). В позиции 77 произошла одношаговая мутация (A>G), которая привела к смене аминокислоты аргинин (Arg) на глицин (Gly). Одношаговые мутации T>C и C>T привели к радикальной смене аминокислот лейцина (Leu) на пролин (Pro) и серина (Ser) на лейцин (Leu). Остальные две замены, так же были вызваны одношаговыми мутациями A>C и A>C, которые в свою очередь привели к смене лизина (Lys) на (Asn) аспарагин в положениях 369 и 386 соответственно.

Так же проведен анализ нуклеотидных последовательностей NS гена на содержание мутаций (таблица 17).

Таблица 17 – Поиск однонуклеотидных полиморфизмов в NS гене.

Штамм, изолят	Позиция нуклеотида	Аминокислота	Замена аминокислоты	Классификация замены	Тип
1	2	3	4	5	6
Karaganda_04_20_NS	687	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NS	696	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NS	699	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NS	745	G>A	p.V83I	Non-synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NS	747	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NS	750	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NS	828	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NS	849	A>G	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_NS	32	A>C	p.E2D [NEP]	Non-synonymous [NEP], Non-synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	584	G>A	p.S29N [NEP]	Non-synonymous [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	640	G>A	p.A48T [NEP]	Non-synonymous [NEP], Non-synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	68	T>C	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	80	T>C	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	134	A>C	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	146	G>A	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	185	C>T	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP

продолжение таблицы 17

1	2	3	4	5	6
Karaganda_04_20_NS	189	A>G	p.K55E [NS1]	Change, genic [NEP], Non-synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	218	T>C	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	230	T>C	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	290	T>C	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	294	A>C	p.I90L [NS1]	Change, genic [NEP], Non-synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	368	C>T	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	401	T>A	p.D125E [NS1]	Change, genic [NEP], Non-synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	417	G>A	p.E131K [NS1]	Change, genic [NEP], Non-synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	422	A>G	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	440	C>T	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	470	A>G	p.(=) [NS1]	Change, genic [NEP], Synonymous [NS1]	SNP
Karaganda_04_20_NS	496	C>T	p.A157V [NS1]	Change, genic [NEP], Non-synonymous [NS1]	SNP
Petropavlovsk_3_2018_NS	68	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_3_2018_NS	78	G>A		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_3_2018_NS	101	A>T		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_3_2018_NS	102	AA>GG		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_3_2018_NS	152	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_3_2018_NS	157	G>A		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_NS	68	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_NS	101	A>T		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_NS	102	AA>GG		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_NS	152	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_1_2018_NS	32	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_1_2018_NS	68	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_1_2018_NS	101	A>T		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_1_2018_NS	102	AA>GG		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_1_2018_NS	128	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_1_2018_NS	152	T>C		Change, intergenic	SNP

продолжение таблицы 17

1	2	3	4	5	6
Petropavlovsk_1_2018_NS	157	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	31	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	67	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	79	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	133	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	145	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	184	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	188	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	217	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	229	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	289	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	293	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	367	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	400	T>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	416	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	421	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	439	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	469	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	495	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	583	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	639	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	686	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	695	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	698	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	744	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	746	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	749	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	827	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_NS	848	A>G		Change, intergenic	SNP

Анализ показал, что штаммы А/свинья/Караганда/03/20 и А/свинья/Караганда/04/20 содержали по 28 мутаций. Для штамма А/свинья/Петропавловск/03/18 в NS гене было обнаружено 6 мутаций, для штамма А/свинья/Петропавловск/02/18 – 4 мутации, а для штамма А/свинья/Петропавловск/01/18 было выявлено 7 мутаций. Следует отметить, что несинонимичные мутации были выявлены только у штаммов А/свинья/Караганда/04/20 и А/свинья/Петропавловск/01/18. Причем у штамма А/свинья/Петропавловск/01/18 регистрировалась только одна одношаговая (A>C) несинонимичная замена которая привела к смене глутаминовой кислоты (Glu) на аспарагиновую кислоту (Asp) по второму положению белка NS1. Эта же замена регистрировалась у штамма А/свинья/Караганда/04/20. Замена носит консервативный характер согласно таблице физико-химических дистанций Грентсема. Помимо указанной несинонимичной мутации, у штамма А/свинья/Караганда/04/20 было выявлено еще семь мутаций. Две одношаговые мутации (G>A) в белке NEP по положениям 29 (S29N) и 48 (A48T), которые привели к замене серина (Ser) на аспарагин (Asn) и аланина (Ala) на треонин (Thr). Обе мутации

носят консервативный характер и, вероятно, мало оказывают влияния на биохимические свойства белка NEP. Остальные пять мутаций были найдены в NS1 белке. Так мутация A>G приведшая к смене аминокислоты лизин (Lys) на глутаминовую кислоту (Glu) в позиции 55, носила консервативный характер. Мутация A>C в положении 90 привела к замене изолейцина (Ile) на лейцин (Leu), мутация T>A в положении 125 к замене аспарагиновой кислоты на глутаминовую кислоту (D125E).

В позиции 131 произошла мутация G>A, что вызвало появление лизина вместо глутаминовой кислоты (E131K). Еще одна мутация (C>T) привела к замене аланина (Ala) на валина (Val) в положении 157 (A157V).

Показано, что данные замены носят консервативный характер и, по всей видимости, не приводят к значительным изменениям структуры и функции белка, однако могут служить критериями для оценки генетического разнообразия.

Аналогичные исследования проведены по М гену (таблица 18).

Таблица 18 – Поиск однонуклеотидных полиморфизмов в М гене.

Штамм, изолят	Позиция нуклеотида	Аминокислота	Замена аминокислоты	Классификация замены	Тип
1	2	3	4	5	6
Almaty_45_19_M	85	A>C		Change, intergenic	SNP
Almaty_45_19_M	117	C>T		Change, intergenic	SNP
Almaty_45_19_M	135	A>G		Change, intergenic	SNP
Almaty_45_19_M	153	G>A		Change, intergenic	SNP
Almaty_45_19_M	178	G>A		Change, intergenic	SNP
Almaty_45_19_M	183	A>G		Change, intergenic	SNP
Almaty_45_19_M	186	G>A		Change, intergenic	SNP
Almaty_45_19_M	192	G>A		Change, intergenic	SNP
Almaty_45_19_M	195	T>C		Change, intergenic	SNP
Almaty_45_19_M	261	G>A		Change, intergenic	SNP
Almaty_45_19_M	264	C>T		Change, intergenic	SNP
Almaty_45_19_M	270	T>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	18	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	100	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	127	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	199	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	208	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	283	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	400	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	457	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	466	T>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	517	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	532	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	568	A>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	580	T>G		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	599	G>A		Change, intergenic	SNP

продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6
Karaganda_03_20_M	625	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	647	A>C		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	714	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	775	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	806	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	839	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	863	C>T		Change, intergenic	SNP
Karaganda_03_20_M	950	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_04_20_M	18	G>A		Change, intergenic	SNP
Karaganda_04_20_M	100	A>G	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	127	G>A	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	199	G>A	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	208	G>A	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	283	A>G	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	400	A>C	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	457	C>T	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	466	T>G	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	517	G>A	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	532	A>C	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	568	A>G	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	580	T>G	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	599	G>A	p.V192M [M1]	Change, genic [M2], Non-synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	625	G>A	p.(=) [M1]	Change, genic [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	647	A>C	p.K208Q [M1]	Change, genic [M2], Non-synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	714	G>A	p.R230K [M1]	Change, genic [M2], Non-synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	775	G>A	p.G21D [M2]	Non-synonymous [M2], Synonymous [M1]	SNP
Karaganda_04_20_M	806	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_M	839	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP
Karaganda_04_20_M	863	C>T	p.(=)	Synonymous	SNP

продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6
Karaganda_04_20_M	950	G>A	p.(=)	Synonymous	SNP
Pavlodar_43_19_M	18	T > del 1		Change, intergenic	Indel
Pavlodar_43_19_M	134	T>A		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	185	A>G		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	263	T>C		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	266	C>T		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	281	A>G		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	284	T>C		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	299	A>G		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	302	T>C		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	314	G>A		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	323	G>A		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	329	G>A		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	392	T>C		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	425	T>C		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_43_19_M	434	A>G		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	46	T>C		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	60	CC>TT		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	78	A>G		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	177	A>C		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	179	A>G		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	195	G>A		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	204	G>T		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	210	A>G		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	235	C>T		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	237	G>T		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	280	G>A		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	283	A>G		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	298	A>G		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	324	C>T		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	328	C>T		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	337	C>A		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	361	A>G		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	376	T>C		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	394	T>C		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	397	C>T		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	406	T>C		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	409	C>T		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	424	C>T		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	433	G>A		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	439	C>T		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	469	A>G		Change, intergenic	SNP
Pavlodar_44_19_M	478	G>A		Change, intergenic	SNP

продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6
Petropavlovsk_1_2018_M	199	A>G		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_1_2018_M	277	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_1_2018_M	280	C>T		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	55	C>T		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	70	C>T		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	73	A>G		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	97	C>A		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	148	T>A		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	199	A>G		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	268	A>G		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	277	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	280	C>T		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	295	A>G		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	298	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	313	A>G		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	316	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	328	G>A		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	337	G>A		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	343	G>A		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	406	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	439	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	448	A>G		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	460	C>T		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	478	C>T		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	511	C>T		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	514	G>A		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	539	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_2_2018_M	547	A>G		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_3_2018_M	277	T>C		Change, intergenic	SNP
Petropavlovsk_3_2018_M	295	A>G		Change, intergenic	SNP

Наличие 12 мутаций было выявлено у штамма А/свинья/Алматы/45/19, по 22 мутации обнаружено для штаммов А/свинья/Караганда/03/20 и А/свинья/Караганда/04/20, 15 мутаций для штамма А/свинья/Павлодар/43/19, 27 мутаций для штамма А/свинья/Павлодар/44/19, 3 мутации у штамма А/свинья/Петропавловск/01/18, 25 мутаций у штамма А/свинья/Петропавловск/02/18 и 2 мутации у штамма А/свинья/Петропавловск/03/18. Все обнаруженные мутации носили синонимичный характер, без смены аминокислоты. Только у двух штаммов А/свинья/Караганда/03/20 и А/свинья/Караганда/04/20 обнаружено 4 несинонимичные замены, из которых лишь одна замена по 21 положению в М2 белке (G21D) носила радикальный характер согласно значению физико-химической дистанции Грентсема.

В заключение проведен анализ М и NA генов по поиску факторов ответственных за формирование лекарственной устойчивости к терапевтическим препаратам ремантадин и тамифлю.

Так для штаммов А/свинья/Алмата/45/19, А/свинья/Караганда/03/20 и А/свинья/Караганда/04/20 в структуре белка М2 была обнаружена мутация S31N, отвечающая за формирование устойчивости к препаратам адамантанового ряда. У остальных штаммов не было выявлено мутаций ведущих к увеличению резистентности к препаратам блокаторам М2 канала.

Аналогичные исследования проведены по поиску маркерных мутаций отвечающих за формирование устойчивости к ингибиторам нейраминидазы в гене NA. Анализ нуклеотидных последовательностей казахстанских штаммов не выявил наличия мутаций, отвечающих за формирование фенотипа устойчивости к ингибиторам NA (осельтамивир и его производные).

В дальнейших исследованиях проведен поиск рекомбинантных событий в нуклеотидных последовательностях казахстанских изолятов.

Используя полученные выравнивания нуклеотидных последовательностей, проведен рекомбинантный анализ внутри генов М и NA исследуемых казахстанских изолятов в программном обеспечении RDP 4 [221].

Для оценки рекомбинационных событий М и NA генов использовалось семь методов - RDP, BOOTSCAN, MAXCHI, CHIMAERA, 3SEQ, GENECONV и SISCAN. Из-за ограничений производительности программы текущий набор нуклеотидных последовательностей был сокращен с 1024 до 250 [221]. В ходе проведенного анализа пятью методами из семи, была определена возможная рекомбинация внутри гена М у штамма А/свинья/Павлодар/43/19 (рисунки 28 - 30).

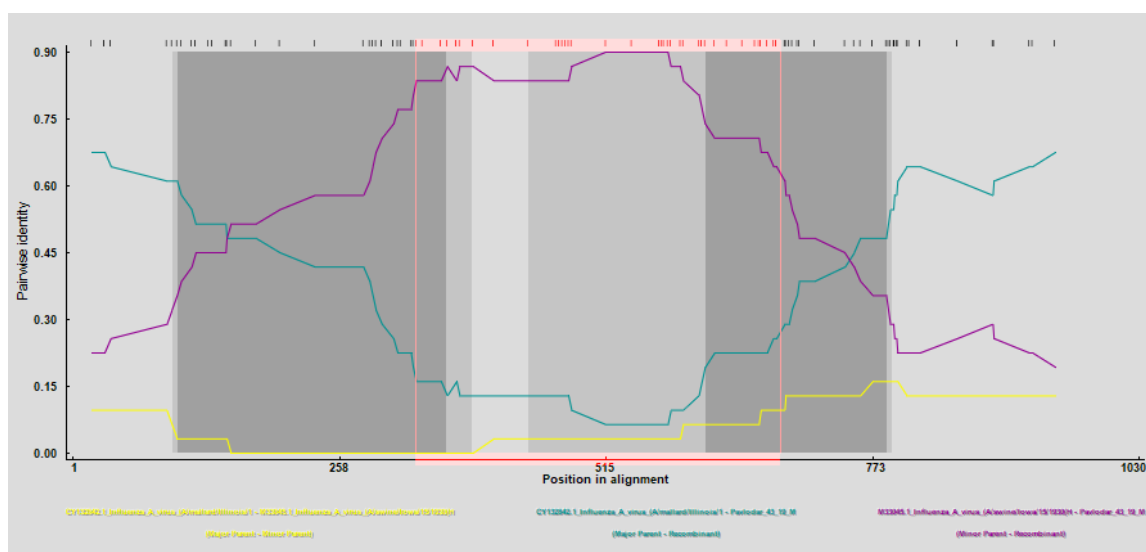


Рисунок 28 - Оценка реассортации методом RDP

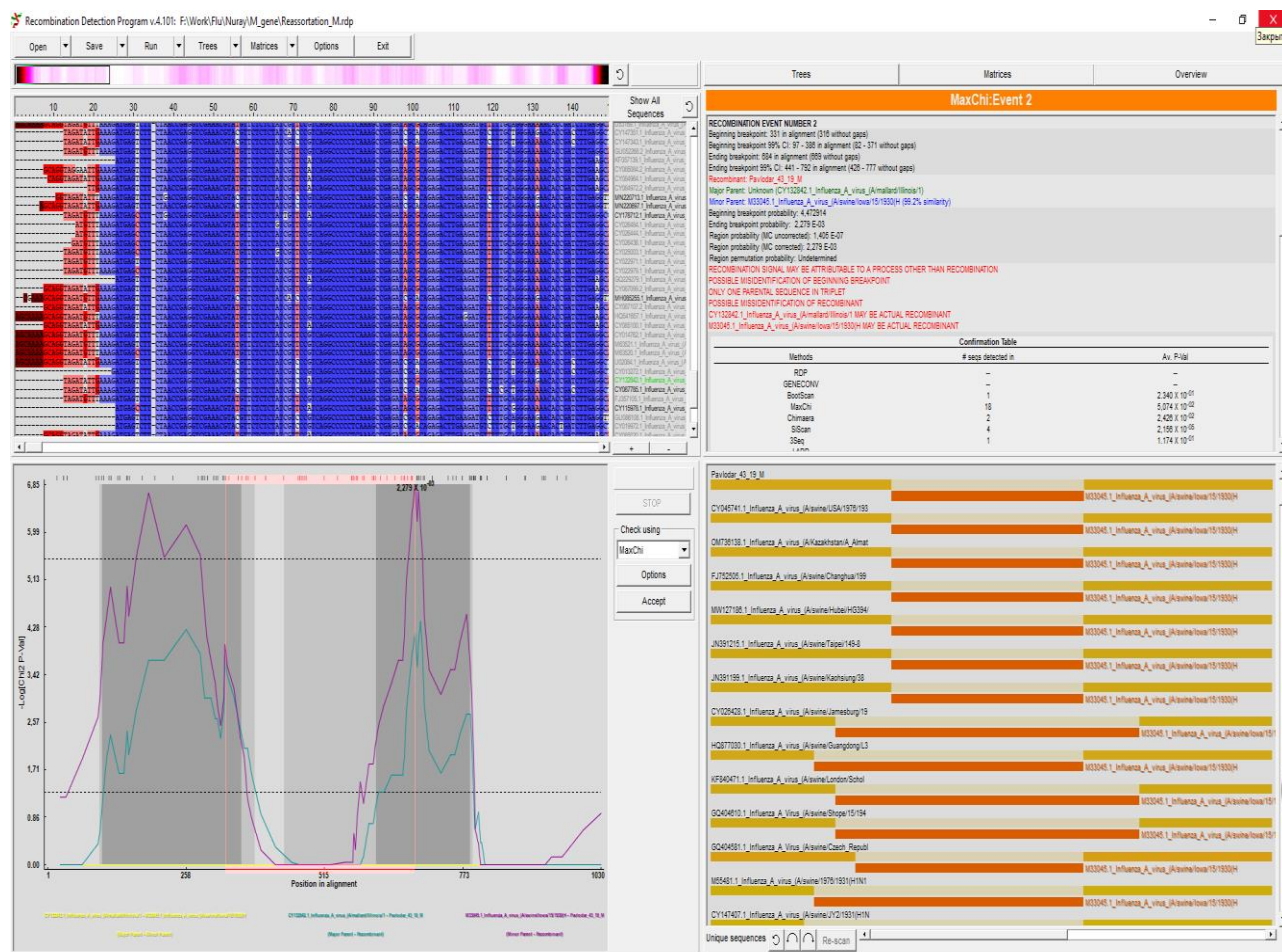


Рисунок 29 - Результаты работы программы RDP



Рисунок 30 - Оценка реассортации методом MaxChi

Вероятная вставка находится в регионе 331-684. Основной родительской последовательностью является штамм A/mallard/Illinois/10OS3243/2010. Минорным родительским штаммом, от которого и была приобретена вставка 331-684, является штамм A/swine/Iowa/15/1930(H1N1)).

Поиск реассортационных событий у штамма А/свинья/Павлодар/44/19 не дал положительных результатов. По всей видимости, генетическая гетерогенность данного штамма является не следствием реассортации, а достаточно интенсивным накоплением мутаций.

В связи с этим, проведена оценка эволюционных расхождений между набором нуклеотидных последовательностей по М гену для штамма А/свинья/Павлодар/44/19. Показано, что коэффициент эволюционного расхождения является наибольшим у этого штамма по сравнению с другими последовательностями и составляет в среднем $0,58 \pm 0,016$.

Аналогичные исследования проведены для набора последовательностей по НА гену. 250 нуклеотидных последовательностей НА гена были проанализированы на наличие реассортации. В ходе проведенного анализа событий реассортации для изучаемых казахстанских последовательностей НА гена выявлено не было.

3.6 Биологические свойства казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018-2019 гг.

3.6.1 Гемагглютинирующая и инфекционная активности казахстанских изолятов

Изучение основных биологических свойств изолятов ВГС 2018 – 2019 гг. проводили в сравнении с казахстанскими штаммами ВГС, выделенными в 2012 – 2014 гг. и референсными вариантами, хранящимися в коллекции лаборатории биохимии вирусов ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии».

В таблице 19 представлены результаты изучения гемагглютинирующей и инфекционной активностей североказахстанских изолятов ВГС (44/19; 43/19; 03/18; 02/18 и 01/18) [222, 223] и алматинского штамма (45/19) в сравнении со штаммами, циркулировавшими в популяциях свиней в различных регионах Казахстана в 2012-2014 гг. [224-226], и с эталонными вариантами ВГ.

Таблица 19 – Титры гемагглютинации и инфекционная активность казахстанских изолятов вирусов гриппа свиней, выделенных в 2018-2019 гг. в сравнении со штаммами вируса гриппа свиней 2012-2014 гг. и с эталонными штаммами вируса гриппа

Штамм	Гемагглютинирующая активность		Инфекционная активность	
	Куриные эмбрионы	Культура клеток MDCK	Куриные эмбрионы, IgЭИД _{50/0,2мл}	Культура клеток MDCK, IgТЦИД _{50/0,2мл}
1	2	3	4	5
6А/свинья/Алматы/45/19	1:1024*	1:64	3,82	2,30
А/свинья/Павлодар/44/19	1:1024	1:32	5,82	3,53
А/свинья/Павлодар/43/19	1:1024	1:64	5,43	3,22
А/свинья/Петропавловск/03/18	1:512	1:16	7,98	5,53

продолжение таблицы 19

1	2	3	4	5
А/свинья/Петропавловск/02/18	1:1024	1:32	7,82	3,91
А/свинья/Петропавловск/01/18	1:1024	1:32	6,50	4,22
А/свинья/Актобе/15/14	1:512	1:32	3,43	2,44
А/свинья/Актобе/10/14	1:1024	1:64	4,23	2,67
А/свинья/Костанай/23/14	1:1024	1:64	4,23	3,23
А/свинья/Костанай/06/12	1:128	1:16	4,67	3,23
А/California/04/09 (H1N1) pdm	1:512	1:32	8,00	6,78
А/New Jersey/8/76 (H1N1)	1:512	1:64	8,78	6,53
А/USA/1976/31 (Hsw1N1)	1:1024	1:64	8,00	5,23
А/swine/Iowa/15/30 (Hsw1N1)	1:1024	1:128	8,78	5,23
А/Wisconsin/67/05 (H3N2)	1:1024	1:32	6,78	5,23
Примечание - *титры гемагглютинирующей активности в РГА.				

Гемагглютинирующая активность штаммов ВГС, изолированных в 2018-2019 гг., на КЭ составила 1:512 – 1:1024 и на культуре клеток MDCK: 1:16 – 1:64. Инфекционная активность данных изолятов на КЭ варьировала в пределах 3,82–7,98 lg ЭИД_{50/0,2} мл и на КК MDCK - 2,30-5,53 lg ТЦД_{50/0,2} мл.

Петропавловские штаммы ВГС (03/18; 02/18 и 01/18) обладали наибольшей инфекционной активностью как на КЭ (6,50 – 7,98 lg ЭИД_{50/0,2} мл), так и на КК MDCK (3,91-5,53 lg ТЦД_{50/0,2} мл), и были схожи с референсными штаммами. Алматинский изолят (45/19) обладал инфекционной активностью 3,82 lg ЭИД_{50/0,2} мл на КЭ и 2,30 lg ТЦД_{50/0,2} мл на КК MDCK, и по этим параметрам был наиболее схож с актюбинским штаммом, выделенным в 2014 г. (15/14) (таблица 19).

Таким образом, казахстанские штаммы ВГС 2018-2019 гг. различались внутри популяции между собой и с эталонными вариантами по гемагглютинирующей и инфекционной активностям. Североказахстанские изоляты ВГС 2018-2019 гг. обладали наибольшей инфекционной активностью как на КЭ, так и на КК MDCK.

3.6.2 Термочувствительность гемагглютинирина и степень адсорбции и элюции вируса с эритроцитов

Поверхностный гликопротеин НА опосредует проникновение вируса и играет важную роль в рестрикции, передаче и патогенезе вируса. Термостабильность НА, которая измеряется по остаточной жизнеспособности после инкубации при повышенной температуре (в диапазоне температур 50-60°C) в РГА, адсорбция на эритроцитах и последующая элюция вируса являются его важными характеристиками [227, 228].

В таблице 20 представлены результаты изучения титра гемагглютинации в РГА после прогревания при 56°C в течение 60 мин., способность адсорбции на куриных эритроцитах и элюции казахстанских изолятов ВГС,

циркулировавших в популяциях свиней Казахстана в 2018-2019 гг., в сравнении с эталонными штаммами ВГ и вирусами, выделенными от свиней ранее (2012-2014 гг.).

Таблица 20 – Термочувствительность гемагглютинаина, адсорбция и элюция казахстанских изолятов вируса гриппа свиней 2018–2019 гг. с эритроцитов кур

Штамм	Термостабильность гемагглютинаина		Адсорбция на куриных эритроцитах, %	Время элюции с куриных эритроцитов при 37° С, ч
	нативный вирус	вирус после прогревания при 56° С в течение 60 мин		
А/свинья/Алматы/45/19	9,7±0,09*	9,6±0,09	90	0,5
А/свинья/Павлодар/44/19	9,8±0,09	9,6±0,06	100	1,0
А/свинья/Павлодар/43/19	8,9±0,08	9,8±0,04	90	1,0
А/свинья/Петропавловск/03/18	9,7±0,06	9,3±0,09	100	0,5
А/свинья/Петропавловск/02/18	9,6±0,04	9,6±0,08	100	1,0
А/свинья/Петропавловск/01/18	9,7±0,08	9,6±0,08	90	1,0
А/свинья/Актобе/15/14	6,6±0,06	5,0±0,0	100	1,0
А/свинья/Актобе/10/14	6,0±0,0	4,6±0,06	90	0,5
А/свинья/Костанай/23/14	10,0±0,0	6,2±0,05	90	1,0
А/свинья/Костанай/06/12	9,8±0,08	6,6±0,06	100	1,0
А/California/04/09 pdm	8,7±0,06	6,6±0,06	100	1,0
А/New Jersey/8/76	9,7±0,06	6,3±0,06	100	1,0
А/swine/USA/1976/31	8,7±0,03	6,6±0,06	90	0,5
А/swine/Iowa/15/30	9,7±0,06	6,3±0,03	100	1,0
А/Wisconsin/67/05	7,7±0,04	6,3±0,04	90	1,0
Примечание - *представлены среднегеометрические логарифмы обратных титров гемагглютининов после прогревания при 56°С.				

При изучении термочувствительности НА установлено, что североказахстанские изоляты (44/19; 43/19; 03/18; 02/18 и 01/18) и алматинский штамм (45/19) были отнесены к наиболее термостабильным вариантам, поскольку сохраняли способность вызывать агглютинацию эритроцитов курицы в высоких титрах от $9,3 \pm 0,09 \log_2$ до $9,8 \pm 0,4 \log_2$ после 60 мин. прогревания при 56°С. По данному признаку у казахстанских штаммов ВГС 2018-2019 гг. титр гемагглютинации был на три порядка выше титра гемагглютинации изолятов ВГС 2012-2014 гг. и референсных вариантов ВГ, которые в свою очередь сформировали гомогенную группу, так как вызывали агглютинацию эритроцитов курицы в пределах титров от $4,6 \pm 0,06 \log_2$ до $6,6 \pm 0,06 \log_2$.

Североказахстанские и алматинский изоляты 2018-2019 гг. отличались большей устойчивостью НА к температурному фактору по сравнению с актюбинскими (2012 г.) и костанайскими (2014 г.) штаммами, которые в свою очередь по данному свойству проявили сходство с эталонными вариантами.

При изучении адсорбирующей и элюирующей активностей штаммов ВГС 2018-2019 гг. больших различий по этим признакам от изолятов, выделенных в 2012-2014 гг., и от эталонных штаммов не выявлено. Установлено, что все казахстанские штаммы ВГС, как и референсные вирусы обладали хорошей адсорбирующей способностью по отношению к эритроцитам кур (90–100 %) и их элюция с эритроцитов происходила в течение 30 - 60 мин. при 37°C инкубации (таблица 20).

Таким образом, казахстанские штаммы ВГС, выделенные в 2018-2019 гг., обладали термостабильным НА и хорошей адсорбирующей и элюирующей активностью.

3.6.3 Спектр гемагглютинирующей активности штаммов вируса гриппа свиней

Известно, что эритроциты различных видов животных отличаются по составу олигосахаридов. Так, эритроциты кур и человека содержат N-ацетилсиаловую кислоту, связанную с галактозой, тогда как эритроциты лошади обладают N-гликолилсиаловой кислотой. Поэтому исследование вирусной агглютинации с эритроцитами разных видов животных могут быть полезны для характеристики рецепторной специфичности вирусов гриппа А [202].

В таблице 21 представлены результаты изучения спектра гемагглютинирующей активности североказахстанских (44/19; 43/19; 03/18; 02/18 и 01/18) и алматинского (45/19) штаммов с эритроцитами курицы, морской свинки, барана, лошади и человека I(0) группы крови.

Таблица 21 - Гемагглютинирующая активность штаммов вируса гриппа А, выделенных от свиней в 2018–2019 гг. по отношению к эритроцитам человека и различных видов животных

Изолят, штамм	Курица	Морская свинка	Баран	Лошадь	Человек, группа крови I(0)
1	2	3	4	5	6
А/свинья/Алматы/45/19	8,8±0,1*	11,0±0,05	10,3±0,05	8,0±0,0	10,1±0,1
А/свинья/Павлодар/44/19	8,7±0,05	9,8±0,06	10,0±0,0	7,0±0,0	10,3±0,05
А/свинья/Павлодар/43/19	8,2±0,1	10,2±0,1	9,7±0,05	6,3±0,05	10,8±0,1
А/свинья/Петропавловск/03/18	9,5±0,04	10,5±0,07	10,0±0,0	9,4±0,1	10,3±0,1

продолжение таблицы 21

1	2	3	4	5	6
А/свинья/Петропавловск/02/18	9,6±0,08	10,5±0,08	10,0±0,0	9,7±0,05	10,4±0,05
А/свинья/Петропавловск/01/18	9,5±0,04	10,1±0,1	10,0±0,0	9,6±0,08	10,4±0,1
А/свинья/Актобе/15/14	6,6±0,05	6,3±0,05	8,3±0,05	-**	7,3±0,05
А/свинья/Актобе/10/14	6,0±0,0	5,3±0,05	8,3±0,05	-	5,6±0,05
А/свинья/Костанай/23/14	10,0±0,0	11,0±0,0	8,7±0,05	-	10,0±0,0
А/свинья/Костанай/06/12	9,8±0,06	11,0±0,0	8,0±0,2	-	9,3±0,1
А/California/04/09 pdm	8,7±0,05	9,3±0,08	6,6±0,05	<1,0	8,0±0,0
А/New Jersey/8/76	10,3±0,05	11,7±0,02	8,7±0,05	<1,0	10,2±0,1
А/swine/USA/1976/31	8,8±0,1	11,0±0,0	8,1±0,1	9,7±0,05	9,1±0,1
А/swine/Iowa/15/30	9,7±0,05	12,0±0,0	9,5±0,04	8,7±0,05	9,6±0,1
А/Wisconsin/67/05	7,7±0,1	8,7±0,05	9,8±0,04	<1,0	9,4±0,1
Примечания: 1 * - представлены среднегеометрические логарифмы (GMT) с основанием 2 для обратных титров гемагглютининов; 2 ** - не агглютинировали.					

Из таблицы 21 видно, что агглютинирующая способность казахстанских изолятов ВГС 2018-2019 гг. варьировала от минимальных титров (6,3±0,05) с лошадиными эритроцитами, в случае со штаммом 43/19, до максимальных показателей, отмеченных у варианта 45/19 по отношению к эритроцитам морской свинки (11,0±0,05).

Изоляты ВГС, выделенные в 2018-2019 гг., в отличие от штаммов ВГС 2012-2014 гг. и эталонных вариантов (А/California/04/09pdm; А/Wisconsin/67/05) активно агглютинировали лошадиные эритроциты в пределах 6,3±0,05 - 9,7±0,05.

В целом, казахстанские штаммы ВГС, выделенные в 2018–2019 гг., связывались с эритроцитами курицы, морской свинки, барана, лошади и человека «0» группы крови в достаточно высоких титрах от 6,3±0,05 до 11,0±0,05 и образовывали по этому признаку гомогенную популяцию между

собой, но отличались от ВГ, циркулирующих среди свиней ранее (2012-2014 гг.).

3.6.4 Чувствительность к сывороточным ингибиторам

Важным биологическим свойством ВГ является чувствительность к ингибиторам нормальных сывороток различных видов животных. От уровня активности ингибиторов сыворотки крови во многом зависит степень распространенности и частота выделяемости различных антигенных вариантов вируса гриппа. По устойчивости к прогреванию различают две основные группы сывороточных ингибиторов: термолабильные β -ингибиторы и термостабильные α - и γ – ингибиторы. Чувствительность ВГ к ним тесно связана с функцией НА, изменение структуры которого сопровождается изменением профиля ингибиторочувствительности вируса. Каждый подтип НА ВГ(А) чувствителен строго к определенной группе сывороточных ингибиторов [229-233].

В таблице 22 представлены результаты изучения чувствительности свиных штаммов, выделенных в 2018-2019 гг., к неспецифическим ингибиторам сывороток крови морской свинки, курицы и кролика. Ингибиторочувствительность определяли в РТГА с нативными; прогретыми 30 минут при температуре 62°C и в течение 10 минут при 100°C сыворотками крови животных, взятых в эксперимент.

ГА казахстанских изолятов ВГС 2018-2019 гг. не подавлялась неспецифическими нативными сыворотками животных, взятыми в эксперимент. Однако прогревание и кипячение сывороток приводило к сохранению или к повышению их ингибирующей активности, что являлось отличительной особенностью неспецифических ингибиторов сывороток крови. Титры ингибиторов возрастали в сыворотках, прогретых 30 мин. при температуре 62°C, и еще более - при кипячении в течение 10 мин. при 100°C. Повышение температуры прогревания до 100°C усиливало ингибиторные свойства всех взятых в эксперимент сывороток до 1:40-1:160 (таблица 22).

Таблица 22 – Чувствительность казахстанских изолятов вируса гриппа свиней 2018–2019 гг. к неспецифическим ингибиторам сывороток крови различных животных

Штамм	Сыворотка крови								
	морская свинка			курица			кролик		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
А/свинья/Алматы/45/19	< 20	40	160	< 20	80	160	< 20	80	160
А/свинья/Павлодар/44/19	< 20	20	80	< 20	40	40	< 20	40	80
А/свинья/Павлодар/43/19	< 20	40	80	< 20	40	80	< 20	20	40
А/свинья/Петропавловск/03/18	< 20	40	80	< 20	160	160	< 20	80	160

продолжение таблицы 22

Штамм	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A/свинья/Петропавловск/02/18	< 20	40	80	< 20	80	80	< 20	80	160
A/свинья/Петропавловск/01/18	< 20	20	160	< 20	40	80	< 20	20	40
A/свинья/Актобе/15/14	< 20	40	80	< 20	< 20	80	< 20	80	160
A/свинья/Актобе/10/14	< 20	20	40	< 20	< 20	40	< 20	80	160
A/свинья/Костанай/23/14	<10	40	80	< 20	< 20	40	< 20	< 20	< 20
A/свинья/Костанай/06/12	< 20	80	160	< 20	< 20	20	< 20	< 20	40
A/California/04/09 pdm	< 20	40	80	< 20	< 20	40	< 20	80	80
A/New Jersey/8/76	< 20	40	80	< 20	< 20	20	< 20	80	80
A/swine/USA/1976/31	< 20	80	80	< 20	< 20	40	< 20	40	160
A/swine/Iowa/15/30	< 20	40	80	< 20	< 20	40	< 20	80	160
A/Wisconsin/67/05	< 20	40	160	< 20	80	160	< 20	80	160
Примечания: 1 - нативные сыворотки; 2 - прогревание 30 мин при 62°C; 3 - кипячение 10 мин при 100°C. Представлены обратные величины титров неспецифических ингибиторов.									

Таким образом, казахстанские штаммы ВГС, выделенные в 2018-2019 гг., сформировали однородную группу по ингибиторочувствительности и были схожи по этому признаку с ВГС 2012-2014 гг. и референсными штаммами.

3.6.5 Чувствительность к противовирусным препаратам

Комплексное лечение гриппа, как и других респираторных вирусных инфекций, в настоящее время предполагает использование различных препаратов: специфические средства, действующие непосредственно на вирусы; интерфероны и индукторы интерферонов, способные подавлять синтез вирусных частиц; иммуномодуляторы, коррегирующие нарушения иммунитета, возникающие на фоне вирусных инфекций; симптоматические средства, оказывающие воздействия на общие симптомы (температура, болевой синдром, кашель); патогенетические средства, используемые при интоксикации, обезвоживании, аллергических реакциях и др. [234, 235].

Наилучшие результаты в лечении гриппа достигаются при воздействии на инфекцию этиотропных препаратов, то есть узкоспецифичных средств, имеющих своей мишенью ту или иную составную часть вириона ВГ.

К сожалению, этиотропные препараты еще не заняли ведущего места в терапии вирусных инфекций, хотя в случае их правильного применения эффективность лечения может достигать 100% в кратчайшие сроки. Одной из проблем, мешающим эффективно использовать этиотропные противогриппозные средства, является быстрое формирование резистентности к ним у различных штаммов вируса [236-239]. Поэтому чувствительность к химиопрепаратам является одним из важных свойств актуальных эпидемических штаммов ВГ для формирования и уточнения клинического протокола.

Для изучения степени устойчивости казахстанских штаммов ВГС к этиотропным препаратам были использованы наиболее распространенные в Казахстане противогриппозные средства: Ремантадин (блокатор ионного канала), Тамифлю (ингибитор нейраминидазы), Арбидол (специфический шаперон НА), Ингавирин (ингибитор NP-белка) [182, 183, 240].

3.6.5.1 Эмбриотоксичность противогриппозных препаратов на куриных эмбрионах

При изучении эмбриотоксичности препарата установлено, что в контрольной группе гибель составила два КЭ на группу из 15 особей (13,33%).

Показано, что величина эмбриотоксичности зависит от разведения препарата. Результаты изучения эмбриотоксичности препаратов Ремантадин, Тамифлю, Арбидол и Ингавирин представлены в таблице 23 и на рисунке 31.

Таблица 23 – Эмбриотоксичность этиотропных противогриппозных препаратов

Доза препарата (мг/КЭ)	Вылупившиеся (выжившие) цыплята									
	Ремантадин		Тамифлю		Арбидол		Ингавирин		Контроль	
	%	число	%	число	%	число	%	число	%	число
10,00	0,00	0	33,33	5	26,67	4	86,67	13	86,67	13
5,00	33,33	5	53,33	8	33,33	5	86,67	13	86,67	13
2,50	53,33	8	80,00	12	73,33	11	86,67	13	86,67	13
1,25	80,00	12	86,67	13	86,67	13	86,67	13	86,67	13
0,63	86,67	13	86,67	13	86,67	13	93,33	14	86,67	13
0,31	86,67	13	100,00	15	86,67	13	86,67	13	86,67	13
0,16	86,67	13	93,33	14	93,33	14	93,33	14	86,67	13
0,08	93,33	14	93,33	14	86,67	13	93,33	14	86,67	13
0,04	93,33	14	93,33	14	93,33	14	100,00	15	86,67	13
Всего	63,70	86	77,78	105	72,59	98	90,37	122	86,67	117

Установлено, что Ингавирин не обладал токсическим действием в отношении КЭ во всех исследованных дозах. Тамифлю и Арбидол проявили сходные показатели токсичности по отношению к КЭ: доля выживаемости снизилась по сравнению с контролем в дозе 2,50 мг/КЭ, при максимальной концентрации препаратов выживаемость эмбрионов составила около 30% (33,33% у Тамифлю и 26,67% у Арбидола). Наибольшая степень токсичности выявлена у Ремантадина – уже в дозе 1,25 мг/КЭ смертность эмбрионов

превысила таковую в контрольной группе, в максимальной дозе (10,00 мг/КЭ) не выжил ни один эмбрион.

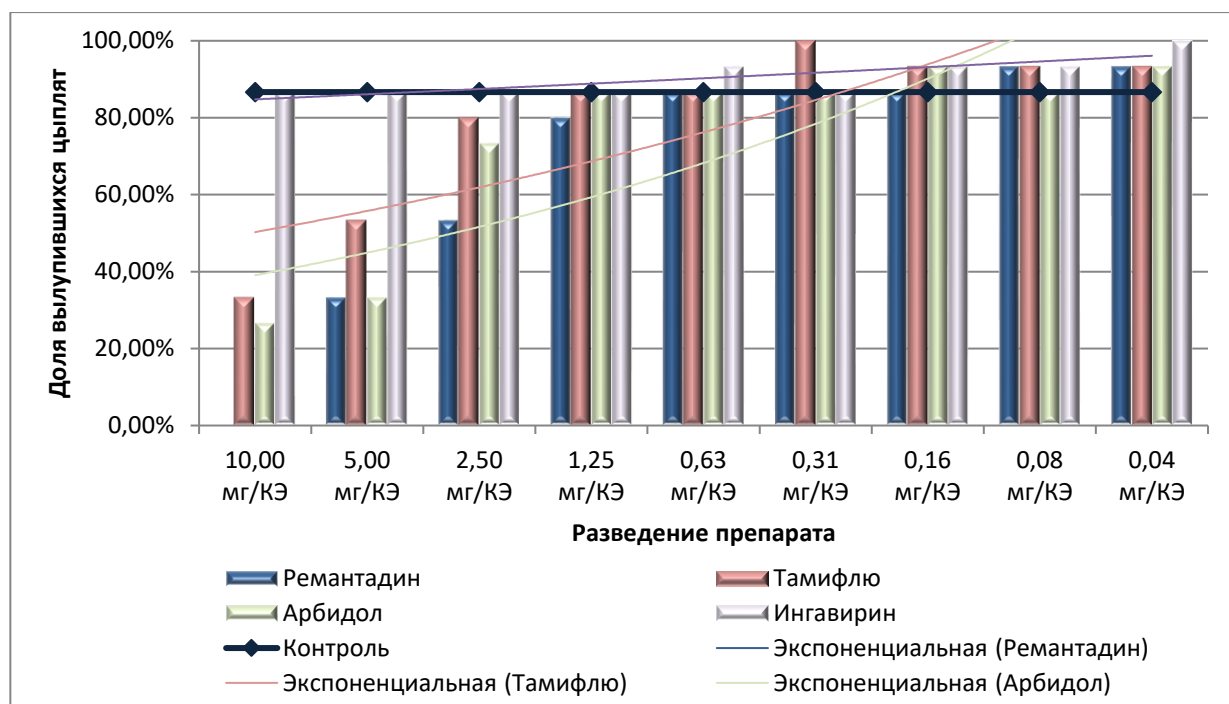


Рисунок 31 – Эмбриотоксичность противогриппозных препаратов

Таким образом, установлено, что исследуемые препараты обладают токсическими свойствами в отношении КЭ в разной степени выраженности: наиболее токсичным оказался Ремантадин, наименее – Ингавирин. Тамифлю и Арбидол проявили среднюю степень токсичности. Полученные результаты коррелируют с данными исследования токсичности данных препаратов на культурах клеток [241, 242].

3.6.5.2 Чувствительность казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018-2019 гг. к различным концентрациям противогриппозных препаратов

Результаты изучения чувствительности казахстанских штаммов ВГС 2018-2019 гг. к различным концентрациям противогриппозных препаратов в сравнении с ВГС, выделенными в Республике ранее (2012-2014 гг.) и референсными штаммами, представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Чувствительность казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018–2019 гг. к противогриппозным препаратам

Изолят, штамм	Ингибирующая концентрация*, мкг/мл			
	Тамифлю	Ремантадин	Арбидол	Ингавирин
А/свинья/Алматы/45/19	1,41±0,06	12,92±0,08	Не ингибирует	Не ингибирует
А/свинья/Павлодар/44/19	2,84±0,05	12,74±0,05	Не ингибирует	Не ингибирует
А/свинья/Павлодар/43/19	2,98±0,05	12,94±0,04	Не ингибирует	Не ингибирует
А/свинья/Петропавловск/03/18	5,70±0,01	3,70±0,10	Не ингибирует	Не ингибирует
А/свинья/Петропавловск/02/18	5,60±0,02	12,70±0,10	Не ингибирует	Не ингибирует
А/свинья/Петропавловск/01/18	6,60±0,10	6,90±0,00	Не ингибирует	Не ингибирует
А/свинья/Актобе/15/14	2,80±0,03	11,80±0,06	Не ингибирует	Не ингибирует
А/свинья/Актобе/10/14	4,10±0,01	14,10±0,03	Не ингибирует	Не ингибирует
А/свинья/Костанай/23/14	12,90±0,10	19,20±0,05	Не ингибирует	Не ингибирует
А/свинья/Костанай/06/12	2,11±0,01	2,42±0,09	Не ингибирует	Не ингибирует
А/California/04/09pdm	3,50±0,00	Не ингибирует	Не ингибирует	Не ингибирует
А/New Jersey/8/76	6,25±0,10	12,65±0,02	Не ингибирует	Не ингибирует
А/swine/USA/1976/31	6,60±0,06	7,00±0,10	Не ингибирует	Не ингибирует
А/swine/Iowa/15/30	6,50±0,10	6,70±0,02	Не ингибирует	Не ингибирует
А/Wisconsin/67/05	1,07±0,05	23,74±0,06	Не ингибирует	Не ингибирует
Примечание - * - указана концентрация препарата, вызывающая снижение репродукции вируса в КЭ в 2 раза.				

Как видно из таблицы 24, казахстанские изоляты 45/19; 44/19 и 43/19 эффективно ингибировались препаратом Тамифлю ИК₅₀ = от 1,41 до 2,98 мкг/мл по сравнению с петропавловскими штаммами 03/18; 02/18 и 01/18 ИК₅₀ = от 5,6 до 6,6 мкг/мл. По данному признаку данные штаммы сходны с референсными вирусами А/California/04/09pdm и А/Wisconsin/67/05, и с казахстанскими штаммами А/свинья/Актобе/15/14, А/свинья/Костанай/06/12, которые также были более чувствительны к Тамифлю (ИК₅₀ = от 1,07 до 2,11 мкг/мл).

Штаммы 45/19; 44/19; 43/19 и 02/18 проявили относительную устойчивость к Ремантадину, так как их репродукция на КЭ подавлялись в более высоких дозах. ИК₅₀ Ремантадина для данных вирусов составила 12,70 – 12,94 мкг/мл. По этому признаку данные изоляты сходны с казахстанскими ВГС А/свинья/Актобе/15/14, А/свинья/Актобе/10/14, А/свинья/Костанай/23/14 и референсными штаммами А/New Jersey/8/76 и А/Wisconsin/67/05. ИК₅₀ которых варьировала от 11,8 до 23,74. Изолят 03/18, как и штамм 06/12 по отношению к Ремантадину, напротив, проявил большую чувствительность (ИК₅₀ = 3,7 и 2,42 мкг/мл). ВГС 01/18, аналогично эталонам А/swine/USA/1976/31 и

A/swine/Iowa/15/30 подавлялся Ремантадином в средних дозах ($IK_{50} = 6,7$ и $7,00$ мкг/мл) (таблица 24).

Североказахстанские 44/19; 43/19; 03/18; 02/18 и 01/18 и алматинский 45/19 штаммы, также как штаммы ВГС 2012-2014 гг. и эталонные варианты оказались резистентными к Арбидолу и Ингавируну, которые не ингибировали репродукцию вирусов даже в высокой концентрации (50 мкг/мл).

Таким образом, установлена гетерогенность казахстанских штаммов ВГС 2018-2019 гг. по отношению противовирусным препаратам. Казахстанские штаммы проявляли резистентность к Арбидолу и Ингавируну и различную степень чувствительности к Тамифлю и Ремантадину.

3.7 Антигенные взаимосвязи казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018 – 2019 гг.

Отличительной чертой ВГ является исключительно высокая изменчивость их антигенных свойств, связанная в первую очередь с наличием сегментированного генома. В наиболее высокой степени изменчивости подвержены поверхностные гликопротеины вируса - НА и НА. При сравнении штаммов ВГ в перекрестной РТГА определяется характер их серологических отношений, которые могут отражать небольшие антигенные различия по НА между сходными штаммами и/или указывать на различия между группами штаммов [243, 244].

Для изучения антигенных взаимосвязей накоплена биомасса казахстанских штаммов ВГС 2018 и 2019 гг. и получены очищенные концентрированные антигены в объеме $1,5-2,7$ мл, с содержанием белка $0,271-1,218$ мг/мл и ГА $256000-1024000$ ГАЕ/мл. Характеристика очищенных концентрированных антигенов представлена в таблице 25.

Таблица 25 - Характеристика полученных антигенов

Штамм вируса гриппа А/Н1N1	Объем суспензии, мл	Количество белка, мг/мл	Титр РГА, ГАЕ/мл
А/свинья/Петропавловск/01/18	2,7	0,336	512000
А/ свинья/Петропавловск/02/18	2,0	0,683	256000
А/ свинья/Петропавловск/03/18	2,2	0,485	256000
А/свинья/Павлодар/43/19	1,5	1,218	512000
А/свинья/Павлодар/44/19	2,1	0,271	1024000
А/свинья/Алматы/45/19	2,2	0,729	256000

В результате иммунизации кроликов массой $2,5-3$ кг очищенными вирусосодержащими суспензиями в дозе 150 мкг/животное получены гипериммунные поликлональные сыворотки. Титры специфических антител в РТГА варьировали в пределах $1:160 - 1:5120$ (таблица 26).

Таблица 26 - Титры специфических антител гипериммунных кроличьих сывороток в РТГА

Сыворотка к вирусу	Титр в РТГА
А/свинья /Петропавловск/01/18	1:320
А/свинья /Петропавловск/02/18	1:320
А/свинья /Петропавловск/03/18	1:5120
А/свинья/Павлодар/43/19	1:320
А/свинья/Павлодар/44/19	1:160
А/свинья/Алматы/45/19	1:640

В таблице 27 представлены результаты изучения антигенных взаимосвязей казахстанских штаммов ВГС 2018 – 2019 гг. выделений с кроличьими иммунными сыворотками в перекрестной РТГА в сравнении с ВГ, выделенными от свиней в 2012-2014 гг. и референсными штаммами.

Из данных перекрестной РТГА видно, что казахстанские штаммы ВГС 2018 - 2019 гг. в различной степени проявляли родство с казахстанскими штаммами ВГС А/Н1N1, выделенными в 2012 – 2014 гг., и эталонными вариантами.

Североказахстанские штаммы Н1N1 44/19; 43/19; 03/18; 02/18 и 01/18 взаимодействовали с иммунными антисыворотками к этим же штаммам от 1/4 до гомологичных титров. Также штаммы ВГС, выделенные в 2018-2019 гг, от 1/2 до гомологичных титров реагировали с иммунными сыворотками, полученными к штаммам ВГС 2012-2014 гг. (15/14; 10/14; 23/14 и 06/12). Исследуемые штаммы, за исключением ВГ А/свинья/Алматы/45/19 ингибировались сыворотками А/New Jersey/8/76, А/swine/USA/1976/31 (Н1N1) и А/swine/Iowa/15/30 (Н1N1) от 1/4 до 2 гомологичных титров (1:160 – 1:1280). С антисывороткой к дрейф-варианту А/California/04/09 (Н1N1)pdm они реагировали в более низких титрах (1:40 – 1:20) и не взаимодействовали с антисывороткой к эталонному штамму А/Wisconsin/67/05 с антигенной формулой Н3N2. Алматинский штамм 45/19 в 1/2 гомологичного титра (1:80) взаимодействовал с антисывороткой к вирусу А/Wisconsin/67/05 (Н3N2).

По антигенной структуре НА исследуемые штаммы существенно не отличались между собой, при этом прямые и обратные титры варьировали от 1/16 до гомологичного титра.

Таким образом, антигенный анализ североказахстанских штаммов ВГС, выделенных от свиней в 2018-2019 гг., с использованием кроличьих поликлональных иммунных сывороток, позволил обнаружить их антигенное родство с эталонными вариантами Н1N1 А/New Jersey/8/76, А/swine/USA/1976/31 и А/swine/Iowa/15/30, в то время как алматинский штамм 45/19 показал близкое родство к вирусу А/Wisconsin/67/05(Н3N2).

Таблица 27 – Результаты перекрестной реакции торможения гемагглютинации казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018-2019 гг. с поликлональными иммунными сыворотками

Штамм	Антисыворотка к вирусам гриппа														
	А/свинья/Алматы/45/19	А/свинья/Павлодар/44/19	А/свинья/Павлодар/43/19	А/свинья/Петропавловск/03/18	А/свинья/Петропавловск/02/18	А/свинья/Петропавловск/01/18	А/свинья/Актобе/15/14	А/свинья/Актобе/10/14	А/свинья/Костанай/23/14	А/свинья/Костанай/06/12	А/California/04/09 pdm	А/New Jersey/8/76	А/swine/USA/1976/31	А/swine/Iowa/15/30	А/Wisconsin/67/05
А/свинья/Алматы/45/19	320	>20	>20	20	>20	>20	>20	20	20	>20	>20	>20	>20	>20	80
А/свинья/Павлодар/44/19	<20	160	160	640	320	640	640	320	1280	320	40	320	1280	160	<20
А/свинья/Павлодар/43/19	<20	160	320	640	320	160	640	640	1280	320	20	160	1280	320	<20
А/свинья/Петропавловск/03/18	<20	160	320	2560	160	160	320	640	640	640	40	160	1280	160	<20
А/свинья/Петропавловск/02/18	<20	160	160	2560	320	160	640	1280	1280	320	40	320	1280	160	<20
А/свинья/Петропавловск/01/18	<20	160	160	2560	160	320	320	640	1280	320	40	160	1280	320	<20
А/свинья/Актобе/15/14	<20	160	80	640	160	160	640	320	1280	640	<40	160	640	320	<20
А/свинья/Актобе/10/14	<20	80	320	640	320	160	320	1280	640	320	<40	640	320	160	<20
А/свинья/Костанай/23/14	<20	160	320	640	320	640	640	320	2560	640	40	640	640	640	<20
А/свинья/Костанай/06/12	<20	160	320	640	160	160	640	640	320	640	40	320	320	320	<20
А/California/04/09 pdm	<20	80	160	20	40	20	<40	<40	40	20	160	40	20	40	<20
А/New Jersey/8/76	<20	80	160	1280	160	160	320	640	640	320	40	640	640	160	<20
А/swine/USA/1976/31	<20	160	160	1280	160	80	320	1280	1280	320	20	640	640	640	<20
А/swine/Iowa/15/30	<20	160	160	2560	80	320	320	640	1280	320	40	320	640	640	<20
А/Wisconsin/67/05	160	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	160
Примечание - представлены обратные величины титров антигемагглютининов.															

3.8 Получение лиофильновысушенных препаратов казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018-2019 гг. и сывороток к ним и испытание их чувствительности и специфичности

Одним из необходимых условий работы вирусологической лаборатории является длительное сохранение оригинальных штаммов вирусов без изменений их иммуногенной потенции, а также антигенных и молекулярно-биологических свойств. Наиболее часто используемым и экономичным методом хранения коллекционных культур микроорганизмов и вирусов является сублимационная сушка, которая обеспечивает сохранение в течение продолжительного периода времени ценных свойств штаммов, минимизирует количество их генераций и позволяет сохранять штаммы в удобных для хранения и транспортировки герметично закрытых ампулах [245-250].

Для сохранения основных биологических свойств североказахстанских (44/19; 43/19; 03/18; 02/18 и 01/18) и алматинского (45/19) штаммов ВГС и иммунных кроличьих сывороток, полученных к данным вирусам, использовали метод лиофилизации. Для высушивания отобрали вирусы с титром ГА 1:1024.

После высушивания аллантоисных культур и иммунных кроличьих сывороток были изучены их активности после одного, трех, шести и девяти месяцев хранения при 4°C.

В таблице 28 представлены результаты гемагглютинирующей активности лиофильновысушенных штаммов ВГС после хранения в течение одного-девяти месяцев при 4°C.

Таблица 28 – Гемагглютинирующая активность лиофилизированных казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018 – 2019 гг. после хранения в течение 1 – 9 месяцев

Штамм	Титр гемагглютинирующей активности				
	До высушивания	После хранения в течение			
		1 мес.	3 мес.	6 мес.	9 мес.
А/свинья/Алматы/45/19	1:1024	1:1024	1:512	1:128	1:128
А/свинья/Павлодар/44/19	1:1024	1:512	1:256	1:32	1:16
А/свинья/Павлодар/43/19	1:1024	1:256	1:256	1:256	1:256
А/свинья/Петропавловск/03/18	1:512	1:512	1:512	1:128	1:128
А/свинья/Петропавловск/02/18	1:1024	1:32	1:32	1:32	1:16
А/свинья/Петропавловск/01/18	1:1024	1:1024	1:512	1:128	1:128

ГА лиофильновысушенных штаммов 45/19, 03/18 и 01/18 после хранения в течение одного месяца при 4°C сохранилась на прежнем уровне, у изолятов 44/19 и 43/19 уменьшилась незначительно (в 2–4 раза), а у вируса 02/18 снизилась в 32 раза. В результате трех месяцев хранения ГА изолятов 43/19; 03/18 и 02/18 осталась на прежнем уровне, у штаммов 45/19; 44/19 и 01/18 уменьшилась в два раза. После шести и девяти месяцев хранения ГА всех

штаммов сохранилась на уровне трехмесячного хранения, титры варьировали в пределах 1:16–1:256.

Результаты изучения инфекционной активности лиофильновысушенных штаммов ВГС после хранения в течение одного-девяти месяцев при 4°C представлены в таблице 29.

Таблица 29 – Инфекционная активность лиофилизированных казахстанских штаммов вируса гриппа свиней 2018 – 2019 гг. в течение 1 – 9 месяцев

Штамм	Титр инфекционной активности, lg ЭИД _{50/0,2} мл				
	До высушив ания	После хранения в течение			
		1 мес.	3 мес.	6 мес.	9 мес.
А/свинья/Алматы/45/19	3,92±0,02	3,58±0,03	3,33±0,02	2,78±0,02	1,83±0,01
А/свинья/Павлодар/44/19	4,20±0,03	4,33±0,10	3,84±0,02	1,26±0,01	1,21±0,02
А/свинья/Павлодар/43/19	4,74±0,02	5,16±0,03	4,45±0,03	3,15±0,01	2,68±0,04
А/свинья/Петропавловск/03/18	7,93±0,07	6,85±0,10	5,32±0,10	5,16±0,03	4,41±0,04
А/свинья/Петропавловск/02/18	7,85±0,01	1,75±0,02	1,40±0,03	1,23±0,00	1,07±0,01
А/свинья/Петропавловск/01/18	6,50±0,02	6,32±0,10	5,41±0,02	5,33±0,02	4,50±0,02

Установлено, что после хранения в течение одного месяца инфекционная активность лиофильновысушенных препаратов казахстанских вирусов 45/19; 44/19; 43/19; 03/18 и 01/18 снизилась незначительно (в среднем на 1±1,0 lg ЭИД_{50/0,2}мл), кроме изолята 02/18, у которого этот параметр снизился на 6,1±0,01 lg ЭИД_{50/0,2}мл.

При хранении казахстанских штаммов ВГС 2018 – 2019 гг. в течении трех, шести и девяти месяцев произошло постепенное понижение инфекционной активности в среднем на 1,0±1,0 lg ЭИД_{50/0,2}мл. В результате девяти месяцев хранения инфекционная активность составила 1,47 - 1,08±0,01 lg ЭИД_{50/0,2}мл (таблица 29).

В таблице 30 представлены результаты проверки активности в РТГА лиофильновысушенных иммунных сывороток к казахстанским штаммам ВГС 2018 – 2019 гг. после одного, трех, шести и девяти месяцев хранения.

Активность иммунных кроличьих сывороток к североказахстанским (44/19; 43/19; 03/18; 02/18 и 01/18) и алматинскому (45/19) штаммам ВГС в РТГА после высушивания уменьшилась в два раза (1:80 – 1:1280) по сравнению с исходным материалом (1:160 – 1:5120).

Таблица 30 – Гемагглютинирующая активность лиофилизированных иммунных сывороток к казахстанским штаммам вируса гриппа свиней 2018–2019 гг. после хранения в течение одного, трех, шести и девяти месяцев, в РТГА

Иммунная сыворотка к штамму	Титр в РТГА					
	До высушивания	После высушивания	После хранения в течение			
			1 мес.	3 мес.	6 мес.	9 мес.
А/свинья/Алматы/45/19	1:640	1:320	1:320	1:320	1:320	1:160
А/свинья/Павлодар/44/19	1:160	1:80	1:80	1:80	1:80	1:40
А/свинья/Павлодар/43/19	1:320	1:160	1:160	1:160	1:160	1:80
А/свинья/Петропавловск/03/18	1:5120	1:1280	1:1280	1:1280	1:640	1:640
А/свинья/Петропавловск/02/18	1:320	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
А/свинья/Петропавловск/01/18	1:320	1:160	1:160	1:80	1:80	1:80

После хранения при 4°C от одного до шести месяцев активность данных сывороток не изменялась и сохранялась на уровне значений после высушивания 1:80 – 1:1280.

В течение шести-девяти месяцев хранения активность сывороток в РТГА у двух павлодарских и алматинского вирусов (43/19, 44/19 и 45/19) снизилась в 2 раза, у петропавловских осталась на прежнем уровне, их титры составляли в пределах 1:80 – 1:640 (таблица 30).

Таким образом, сохранение жизнеспособности сублимированных антигенов казахстанских штаммов ВГС 2018–2019 гг. и иммунных сывороток к ним в течение длительного хранения позволяет рекомендовать антигены для использования в качестве стандартных диагностических препаратов для обнаружения специфических антител в сыворотках крови и расшифровки возникающих вспышек ОРВИ, а сыворотки – для идентификации вновь выделенных изолятов ВГ.

Сотрудники лаборатории биохимии вирусов долгие годы сохраняют рабочую коллекцию штаммов ВГ, выделенных от свиней и людей, и эталонных вариантов и сывороток к ним с учетом их потенциальной ценности для развития медицинских, биологических и ветеринарных наук республики Казахстан. Хорошо изученные оригинальные штаммы депонируют в национальной коллекции микроорганизмов РГП на ПХВ "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" МОН РК. Общая схема подготовки штаммов ВГС и сывороток к ним для депонирования в национальной коллекции микроорганизмов представлена на рисунке 32.

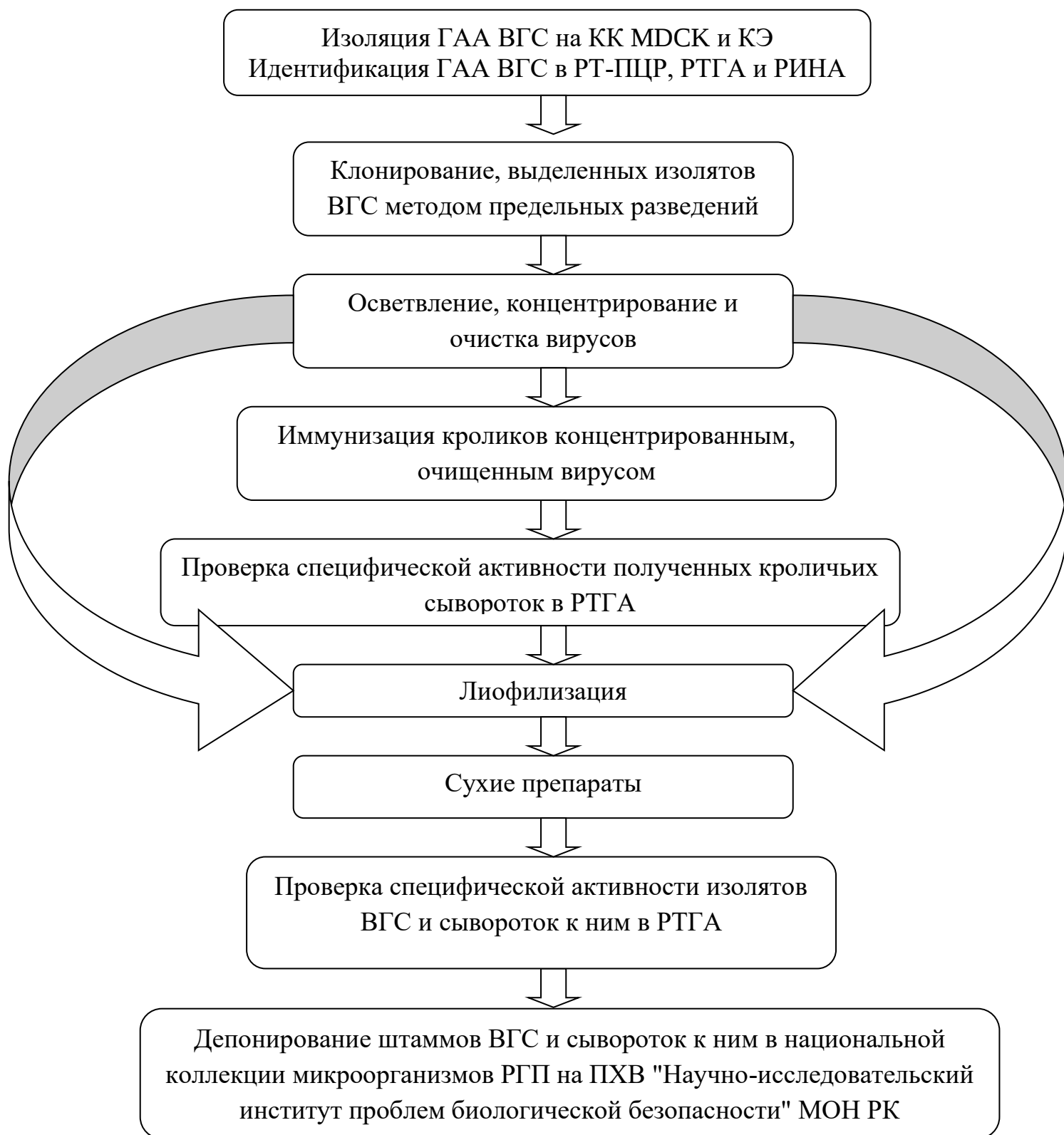


Рисунок 32 - Схема подготовки штаммов ВГС и сывороток к ним для депонирования в национальной коллекции микроорганизмов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены исследования по изучению молекулярно-биологических свойств и особенностей распространения штаммов ВГ, циркулирующих в популяции свиней Казахстана. В результате комплексного изучения биологических образцов выявлена социркуляция ВГ А/Н1N1 и А/Н3N2 в популяциях свиней в различных регионах Казахстана в 2018 – 2019 гг. и изолировано шесть штаммов. Установлено, что часть штаммов ВГС, циркулировавших в популяциях свиней в РК в 2018 – 2020 гг., отнесена к европейской ветви ВГС, а часть к азиатской. В структуре гена белка М2 карагандинских и алматинского штаммов ВГС обнаружена мутация, ответственная за устойчивость к терапевтическим препаратам адамантанового ряда.

Таким образом, выявление штаммов ВГС, циркулирующих на территории Республики Казахстан, изучение их молекулярно-биологических свойств и определение их филогенетической принадлежности значительно расширяют знания в области выявления закономерностей распространения в продолжающейся эволюции ВГС. Выявление двух различных ветвей (европейской и азиатской) в структуре циркулирующих вирусов гриппа А/Н1N1 в популяциях свиней Казахстана также может повлиять на подбор актуальных вакцинных штаммов и минимизировать роль свиней, как источника возникновения новых потенциально опасных вариантов ВГ.

На основании проведенного исследования сделаны следующие выводы:

1. В результате молекулярно-биологического скрининга в РТ-ПЦР 2055 свиных носоглоточных смывов и серологического анализа в реакции торможения гемагглютинации 89 сывороток крови свиней, собранных в животноводческих хозяйствах Алматинской, Карагандинской, Костанайской, Северо-Казахстанской и Павлодарской областей Казахстана в эпидемические периоды с 2018 по 2021 гг., выявлена социркуляция двух подтипов ВГА: Н1N1 и Н3N2, с преобладанием ВГА Н1N1.

2. Из 116 ПЦР-положительных проб на КК МДСК и КЭ выделено шесть штаммов: А/свинья/Алматы/45/19(Н3N2), А/свинья/Павлодар/44/19(Н1N1), А/свинья/Павлодар/43/19(Н1N1), А/свинья/Петропавловск/03/18(Н1N1), А/свинья/Петропавловск/02/18(Н1N1), А/свинья/Петропавловск/01/18(Н1N1).

3. В результате филогенетического анализа трех наиболее вариабельных генов ВГА: НА, NA и NS белка, карагандинские ВГС (03/20; 04/20) отнесены к европейской ветви, а североказахстанские штаммы (43/19; 03/18; 02/18; 01/18) - к азиатской.

4. В структуре гена белка М2 карагандинских ВГС (03/20; 04/20) и алматинского штамма (45/19) обнаружена мутация S31N, отвечающая за формирование устойчивости к Ремантадину.

5. У штамма А/свинья/Павлодар/43/19 в нуклеотидной последовательности гена М определена рекомбинация. Вероятная вставка

находится в положении 331-684. Основной родительской последовательностью данной области является штамм A/mallard/Illinois/10OS3243/2010.

6. Опубликована нуклеотидная последовательность полного генома ВГС А/свинья/Караганда/3/2020 (MZ396822.1 - MZ396828.1) и А/свинья/Караганда/4/2020 (MZ363969.1 - MZ363976.1) в международной базе данных GenBank.

7. Казахстанские штаммы ВГС 2018 - 2019 гг. по адсорбирующей и элюирующей способностям и ингибиторочувствительности проявили сходство между собой и с референсными штаммами, различаясь по гемагглютинирующей и инфекционной активностям; степени чувствительности к противовирусным препаратам (Тамифлю, Ремантадин) и устойчивости гемагглютинина к температурному фактору.

8. Антигенный анализ определил близкое родство штамма А/Алматы/45/19 к вирусу А/Wisconsin/67/05 (H3N2) и североказахстанских штаммов (44/19; 43/19; 03/2018; 02/2018; 01/2018) - к эталонным вирусам ВГ: А/New Jersey/8/76; А/swine/USA/1976/31 и А/swine/Iowa/15/30.

9. Установлено, что лиофильновысушенные препараты ВГС 2018 – 2019 гг. и иммунных кроличьих сывороток сохраняют активность на протяжении девяти месяцев хранения, что позволяет рекомендовать их для использования в качестве стандартных диагностических препаратов при расшифровке возникающих вспышек ОРВИ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Shaw M.L., Palese P. Orthomyxoviridae. In:., editors. Fields Virology. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. P. 1151–85.
2. Nogales A., Aydillo T., Avila-Perez G., Escalera A., Chiem K., Cadagan R., DeDiego M. L., Li F., Garcia-Sastre A., Martinez-Sobrido L. Functional Characterization and Direct Comparison of Influenza A, B, C, and D NS1 Proteins in vitro and in vivo // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Т. 10.
3. Osterhaus A., Rimmelzwaan G. F., Martina B. E. E., Bestebroer T. M., Fouchier R. A. M. Influenza B virus in seals // *Science*. – 2000. – Т. 288, № 5468. – С. 1051-1053.
4. Tsai C. P., Tsai H. J. Influenza B viruses in pigs, Taiwan // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2019. – Т. 13, № 1. – С. 91-105.
5. Guo Y. J., Kuo Y. C., Jin F. G., Wang P., Wang M., Zhu J. M., Chu C. M. Isolation of influenza-C virus from pigs and experimental-infection of pigs with influenza-c virus // *Journal of General Virology*. – 1983. – Т. 64, № JAN. – С. 177-182.
6. Salem E., Cook E. A. J., Lbacha H. A., Oliva J., Awoume F., Aplogan G. L., Hymann E. C., Muloi D., Deem S. L., Alali S., Zouagui Z., Fevre E. M., Meyer G., Ducatez M. F. Serologic Evidence for Influenza C and D Virus among Ruminants and Camelids, Africa, 1991-2015 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2017. – Т. 23, № 9. – С. 1556-1559.
7. Chiapponi C., Faccini S., De Mattia A., Baioni L., Barbieri I., Rosignoli C., Nigrelli A., Foni E. Detection of Influenza D Virus among Swine and Cattle, Italy // *Emerging Infectious Diseases*. – 2016. – Т. 22, № 2. – С. 352-354.
8. Quast M., Sreeniyasan C., Sexton G., Nedland H., Singrey A., Fawcett L., Miller G., Lauer D., Voss S., Pollock S., Cunha C. W., Christopher-Hennings J., Nelson E., Li F. Serological evidence for the presence of influenza D virus in small ruminants // *Veterinary Microbiology*. – 2015. – Т. 180, № 3-4. – С. 281-285.
9. Su S., Fu X. L., Li G. R., Kerlin F., Veit M. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics // *Virulence*. – 2017. – Т. 8, № 8. – С. 1580-1591.
10. Pringle C. R. International committee on taxonomy of viruses (ictv) activity report // *Archives of Virology*. – 1995. – Т. 140, № 11. – С. 2100-2103.
11. Львов Д. Н., Джаркенов А. Ф., Аристова В. А. и др. Изоляция вирусов Дхори (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) и Крымско-Конго геморрагической лихорадки (Bunyaviridae, Nairovirus) от зайца (*Lepus Europaeus*) в среднем поясе дельте Волги, Астраханская область, 2001 // *Вопросы вирусологии*. – 2004. – Т. 47. – С. 32 – 36.
12. Presti R. M., Zhao G. Y., Beatty W. L., Mihindukulasuriya K. A., da Rosa A., Popov V. L., Tesh R. B., Virgin H. W., Wang D. Quarantil, Johnston Atoll, and Lake Chad Viruses Are Novel Members of the Family Orthomyxoviridae // *Journal of Virology*. – 2009. – Т. 83, № 22. – С. 11599-11606.

13. Michalek P., Krejcova L., Adam V., Kizek R. Hemagglutinin structure, membrane fusion and virus entry // *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. – 2015. – №1. – С. 53-56.
14. Tong S. X., Zhu X. Y., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X. F., Recuenco S., Gomez J., Chen L. M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W. L., McBride R., Carney P. J., Gilbert A. T., Chang J., Guo Z., Davis C. T., Paulson J. C., Stevens J., Rupprecht C. E., Holmes E. C., Wilson I. A., Donis R. O. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses // *Plos Pathogens*. – 2013. – Т. 9, № 10.
15. Попов А. Ф., Симакова А. И., Киселев О. И. Грипп: учебное пособие. - СПб: Издательско-полиграфический комплекс «НП-Принт», 2014. - 104 с.
16. Nakatsu S., Murakami S., Shindo K., Horimoto T., Sagara H., Noda T., Kawaoka Y. Influenza C and D Viruses Package Eight Organized Ribonucleoprotein Complexes // *Journal of Virology*. – 2018. – Т. 92, № 6.
17. Muraki Y., Washioka H., Sugawara K., Matsuzaki Y., Takashita E., Hongo S. Identification of an amino acid residue on influenza C virus M1 protein responsible for formation of the cord-like structures of the virus // *Journal of General Virology*. – 2004. – Т. 85. – С. 1885-1893.
18. Эйр Г., Компанс Р. Вирусы гриппа В и гриппа С // *Генетика вирусов гриппа*. - М.: Медицина, 1986. - 336 с.
19. Calder L. J., Wasilewski S., Berriman J. A., Rosenthal P. B. Structural organization of a filamentous influenza A virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Т. 107, № 23. – С. 10685-10690.
20. Chevalier C., Al Bazzal A., Vidic J., Fevrier V., Bourdieu C., Bouguyon E., Le Goffic R., Vautherot J. F., Bernard J., Moudjou M., Noinville S., Chich J. F., Da Costa B., Rezaei H., Delmas B. PB1-F2 Influenza A Virus Protein Adopts a beta-Sheet Conformation and Forms Amyloid Fibers in Membrane Environments // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Т. 285, № 17. – С. 13233-13243.
21. Krug R. M., Alonso-Caplen F. V., Julkunen I., Katze M. G. Expression and replication of the influenza virus genome // *The Influenza Viruses*. – 1989. – С. 89-152.
22. Angelo St. C., Smith G.E. et al. Two of the three influenza viral polymerase proteins expressed by using baculovirus vectors form a complex in insect cells // *Journal of Virology*. - 1987. - Т.61, №2. - С. 361-365.
23. Digard P., Blok V. C., Inglis S. C. Complex-formation between influenza-virus polymerase proteins expressed in xenopus oocytes // *Virology*. – 1989. – Т. 171, № 1. – С. 162-169.
24. Hale B. G., Steel J., Medina R. A., Manicassamy B., Ye J. Q., Hickman D., Hai R., Schmolke M., Lowen A. C., Perez D. R., Garcia-Sastre A. Inefficient Control of Host Gene Expression by the 2009 Pandemic H1N1 Influenza A Virus NS1 Protein // *Journal of Virology*. – 2010. – Т. 84, № 14. – С. 6909-6922.

25. Jin H., Subbarao K., Bagai S. et al. Palmitoylation of the influenza virus hemagglutinin (H3) is not essential for virus assembly or infectivity // *Journal of Virology*. - 1996. - T.70, №3. - C. 1406-1414.
26. Ward C. W. Structure of the influenza virus hemagglutinin. // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. - 1981. - T. 94. - C. 1-74.
27. Wiley D. C., Wilson I. A., Skehel J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of hong-kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation // *Nature*. – 1981. – T. 289, № 5796. – C. 373-378.
28. Skehel J. J., Wiley D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin // *Annual Review of Biochemistry*. – 2000. – T. 69. – C. 531-569.
29. Hamilton B. S., Whittaker G. R., Daniel S. Influenza Virus-Mediated Membrane Fusion: Determinants of Hemagglutinin Fusogenic Activity and Experimental Approaches for Assessing Virus Fusion // *Viruses-Basel*. – 2012. – T. 4, № 7. – C. 1144-1168.
30. Garten W., Klenk H. D. Understanding influenza virus pathogenicity // *Trends in Microbiology*. – 1999. – T. 7, № 3. – C. 99-100.
31. Steinhauer D. A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus // *Virology*. – 1999. – T. 258, № 1. – C. 1-20.
32. Bottcher E., Matrosovich T., Beyerle M., Klenk H.-D., Garten W., Matrosovich M. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium // *Journal of Virology*. – 2006. – T. 80, № 19. – C. 9896-9898.
33. Perdue M. L., Garcia M., Senne D. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses // *Virus Research*. – 1997. – T. 49, № 2. – C. 173-186.
34. Stienekegrobner A., Vey M., Angliker H., Shaw E., Thomas G., Roberts C., Klenk H. D., Garten W. Influenza-virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease // *Embo Journal*. – 1992. – T. 11, № 7. – C. 2407-2414.
35. Klenk H. D., Rott R. The molecular biology of influenza virus pathogenicity // *Advances in Virus Research*. – 1988. – T. 34. – C. 247-281.
36. Burmeister W. P., Ruigrok R. W. H., Cusack S. THE 2.2-A resolution crystal-structure of influenza-b neuraminidase and its complex with sialic-acid // *Embo Journal*. – 1992. – T. 11, № 1. – C. 49-56.
37. Colman P. M., Varghese J. N., Laver W. G. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza-virus neuraminidase // *Nature*. – 1983. – T. 303, № 5912. – C. 41-44.
38. Varghese J. N., Laver W. G., Colman P. M. Structure of the influenza-virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9-a-resolution // *Nature*. – 1983. – T. 303, № 5912. – C. 35-40.
39. <http://visual-science.com>
40. Lamb R. A., Lai C. J., Choppin P. W. Sequences of messenger-rnas derived from genome RNA segment 7 of influenza-virus - colinear and interrupted

messenger-rnas code for overlapping proteins // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences. – 1981. – Т. 78, № 7. – С. 4170-4174.

41. Лэмб Р. Сегменты РНК вируса гриппа и кодированные ими белки // Генетика вирусов гриппа. - М.: Медицина. - 1986. - С. 31-58.

42. Martin K., Helenius A. Transport of incoming influenza-virus nucleocapsids into the nucleus // Journal of Virology. – 1991. – Т. 65, № 1. – С. 232-244.

43. Oneill R. E., Jaskunas R., Blobel G., Palese P., Moroianu J. Nuclear import of influenza-virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import // Journal of Biological Chemistry. – 1995. – Т. 270, № 39. – С. 22701-22704.

44. Avalos R. T., Yu Z., Nayak D. P. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells // Journal of Virology. – 1997. – Т. 71, № 4. – С. 2947-2958.

45. Digard P., Elton D., Bishop K., Medcalf E., Weeds A., Pope B. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments // Journal of Virology. – 1999. – Т. 73, № 3. – С. 2222-2231.

46. Dimmock N.J., Carver A.S., Webster R.G. Categorization of nucleoproteins and matrix proteins from type A influenza viruses by peptide mapping // Virology. - 1980. - Vol.103. - P. 350-356.

47. Shapiro G. I., Krug R. M. Influenza-virus RNA replication invitro - synthesis of viral template rnas and virion rnas in the absence of an added primer // Journal of Virology. – 1988. – Т. 62, № 7. – С. 2285-2290.

48. Vanwyke K. L., Hinshaw V. S., Bean W. J., Webster R. G. Antigenic variation of influenza-A virus nucleoprotein detected with monoclonal-antibodies // Journal of Virology. – 1980. – Т. 35, № 1. – С. 24-30.

49. Соколов Б. И., Руднева И. А., Жданов В. М. Сравнение 35S - метионин меченых олигопептидных карт NP белков вируса гриппа А // Вопросы вирусологии. - 1983. - №5. - С. 539-542.

50. Kobayashi M., Toyoda T., Ishihama A. Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase // Archives of Virology. – 1996. – Т. 141, № 3-4. – С. 525-539.

51. Мейхи Б. Мутанты вируса гриппа // Генетика вирусов гриппа. - М: Медицина, 1986. - 336 с.

52. Galarza J. M., Peng Q. G., Shi L. C., Summers D. F. Influenza a virus RNA-dependent RNA polymerase: Analysis of RNA synthesis in vitro // Journal of Virology. – 1996. – Т. 70, № 4. – С. 2360-2368.

53. Sanzezquerro J. J., Delaluna S., Ortin J., Nieto A. Individual expression of influenza-virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins // Journal of Virology. – 1995. – Т. 69, № 4. – С. 2420-2426.

54. SanzEzquerro J. J., Zurcher T., delaLuna S., Ortin J., Nieto A. The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis // Journal of Virology. – 1996. – Т. 70, № 3. – С. 1905-1911.

55. Nemeroff M. E., Barabino S. M. L., Li Y. Z., Keller W., Krug R. M. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs // *Molecular Cell*. – 1998. – Т. 1, № 7. – С. 991-1000.
56. Chen Z. Y., Li Y. Z., Krug R. M. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3' end processing machinery // *Embo Journal*. – 1999. – Т. 18, № 8. – С. 2273-2283.
57. Lu Y., Qian X. Y., Krug R. M. The influenza-virus NS1 protein - a novel inhibitor of pre-messenger-rna splicing // *Genes & Development*. – 1994. – Т. 8, № 15. – С. 1817-1828.
58. Salvatore M., Basler C. F., Parisien J. P., et al. Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and isn't required for shut of host protein synthesis // *Journal of Virology*. – 2002. – Т. 76, №3. – С. 1206-1212.
59. Aragon T., de la Luna S., Novoa I., Carrasco L., Ortin J., Nieto A. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus // *Molecular and Cellular Biology*. – 2000. – Т. 20, № 17. – С. 6259-6268.
60. Enami M., Enami K. Characterization of influenza virus NS1 protein by using a novel helper-virus-free reverse genetic system // *Journal of Virology*. – 2000. – Т. 74, № 12. – С. 5556-5561.
61. Mariyn R., Zarcher T., Susana de la Luna, Ortin J. Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo // *Journal of General Virology*. – 1997. – Т. 78. – С. 2447-2451.
62. Chen Z. Y., Krug R. M. Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells // *Trends in Microbiology*. – 2000. – Т. 8, № 8. – С. 376-383.
63. Basler C. F., Reid A. H., Dybing J. K., Janczewski T. A., et al. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes // *PNAS*. – 2001. – Т. 98, №5. – С. 2746-2751.
64. Жилинская И. Н., Ляпина Л. А., Киселев О. И., Ашмарин И. П. Белки вируса гриппа моделируют гомеостаз in vitro и in vivo // *Известия РАН. Сер. «Биология»*. – 2003. – №6. – С. 712-719.
65. Жилинская И. Н., Ляпина Л. А., Решетникова О. Ю., Киселев О. И. Роль нейраминидазы в патогенезе гриппозной инфекции // *Вопросы вирусологии*. – 2003. – № 2. – С. 26-28.
66. Swayne D. E. *Animal Influenza*. - 2nd edition. | Ames, Iowa : John Wiley & Sons, Inc., 2017. – 658 с.
67. Manrubia S. C., Escarmis C., Domingo E., Lazaro E. High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies // *Gene*. – 2005. – Т. 347, № 2. – С. 273-282.
68. Turner P. E. Searching for the advantages of virus sex // *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. – 2003. – Т. 33, № 1. – С. 95-108.

69. Nobusawa E., Aoyama T., Kato H., Suzuki Y., Tateno Y., Nakajima K. Comparison of complete amino-acid-sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A-viruses // *Virology*. – 1991. – T. 182, № 2. – C. 475-485.
70. Lee C. W., Suarez D. L. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination // *Animal Health Research Reviews*. – 2005. – T. 6, № 1. – C. 1-15.
71. Buonagurio D. A., Nakada S., Parvin J. D., Krystal M., Palese P., Fitch W. M. Evolution of human influenza-a viruses over 50 years - rapid, uniform rate of change in NS gene // *Science*. – 1986. – T. 232, № 4753. – C. 980-982.
72. Bush R. M., Bender C. A., Subbarao K., Cox N. J., Fitch W. M. Predicting the evolution of human influenza A // *Science*. – 1999. – T. 286, №5446. – C. 1921–1925.
73. Gorman O. T., Bean W. J., Kawaoka Y., Webster R. G. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza-a virus // *Journal of Virology*. – 1990. – T. 64, № 4. – C. 1487-1497.
74. Plotkin J. B., Dushoff J. Codon bias and frequency-dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – T. 100, № 12. – C. 7152-7157.
75. Smith D. J. Applications of bioinformatics and computational biology to influenza surveillance and vaccine strain selection // *Vaccine*. – 2003. – T. 21, № 16. – C. 1758-1761.
76. Hirota Y., Kaji M., Ide S., Kajiwara J., Kataoka K., Goto S., Oka T. Antibody efficacy as a keen index to evaluate influenza vaccine effectiveness // *Vaccine*. – 1997. – T. 15, № 9. – C. 962-967.
77. Garcia M., Suarez D. L., Crawford J. M., Latimer J. W., Slemons R. D., Swayne D. E., Perdue M. L. Evolution of H5 subtype avian influenza A viruses in North America // *Virus Research*. – 1997. – T. 51, № 2. – C. 115-124.
78. Lee C. W., Senne D. A., Linares J. A., Woolcock P. R., Stallknecht D. E., Spackman E., Swayne D. E., Suarez D. L. Characterization of recent H5 subtype avian influenza viruses from US poultry // *Avian Pathology*. – 2004. – T. 33, № 3. – C. 288-297.
79. Swayne D. E., Perdue M. L., Beck J. R., Garcia M., Suarez D. L. Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years // *Veterinary Microbiology*. – 2000. – T. 74, № 1-2. – C. 165-172
80. Dowdle W. R., Schild G. C. Influenza: its antigenic variation and ecology // *Bulletin of the Pan American Health Organization*. – 1976. – T. 10, №3. – C. 193–195.
81. Taubenberger J. K., Morens D. M. 1918 influenza: the mother of all pandemics // *Emerging Infectious Diseases*. – 2006. – T. 12, № 1. – C. 15-22.

82. Wright, P. F., G. Neumann, and Y. Kawaoka. 2007. Orthomyxoviruses. In: Fields Virology, 5th edition, volume 2, D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA. 1691–1740.
83. Smith G. J. D., Vijaykrishna D., Bahl J., Lycett S. J., Worobey M., Pybus O. G., Ma S. K., Cheung C. L., Raghwani J., Bhatt S., Peiris J. S. M., Guan Y., Rambaut A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic // *Nature*. – 2009. – T. 459, № 7250. – C. 1122-U107.
84. McQueen J. L., Steele J. H., Robinson R. Q. Influenza in animals // *Advances in Veterinary Science*. – 1968. – T. 12. – C. 285-336.
85. Alexander D. J., Brown I. H. Recent zoonoses caused by influenza A viruses // *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*. – 2000. – T. 19, № 1. – C. 197-225.
86. Richt J. A., Lager K. M., Janke B. H., Woods R. D., Webster R. G., Webby R. J., Webb Y. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – T. 41, № 7. – C. 3198-3205.
87. Koen J. S. A practical method for field diagnosis of swine diseases // *American Journal Veterinary Medical*. – 1919. – T. 14. – C. 468–470.
88. Shope R. E. The etiology of swine influenza // *Science*. – 1931. – T. 73, № 1886. – C. 214-215.
89. Olsen C. W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America // *Virus Research*. – 2002. – T. 85, № 2. – C. 199-210.
90. Guo Y. J., Kuo Y. C., Jin F. G., Wang P., Wang M., Zhu J. M., Chu C. M. Isolation of influenza-c virus from pigs and experimental-infection of pigs with influenza-C virus // *Journal of General Virology*. – 1983. – T. 64, № JAN. – C. 177-182.
91. Nishimura H., Sugawara K., Kitame F., Nakamura K., Sasaki H. Prevalence of the antibody to influenza-C virus in a northern luzon highland village, Philippines // *Microbiology and Immunology*. – 1987. – T. 31, № 11. – C. 1137-1143.
92. Salez N., Melade J., Pascalis H., Aherfi S., Dellagi K., Charrel R. N., Carrat F., de Lamballerie X. Influenza C virus high seroprevalence rates observed in 3 different population groups // *Journal of Infection*. – 2014. – T. 69, № 2. – C. 182-189.
93. Odagiri T., Matsuzaki Y., Okamoto M., Suzuki A., Saito M., Tamaki R., Lupisan S. P., Sombrero L. T., Hongo S., Oshitani H. Isolation and Characterization of Influenza C Viruses in the Philippines and Japan // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2015. – T. 53, № 3. – C. 847-858.
94. Ran Z. G., Shen H. G., Lang Y. K., Kolb E. A., Turan N., Zhu L. H., Ma J. J., Bawa B., Liu Q. F., Liu H. X., Quast M., Sexton G., Krammer F., Hause B. M., Christopher-Hennings J., Nelson E. A., Richt J., Li F., Ma W. J. Domestic Pigs Are Susceptible to Infection with Influenza B Viruses // *Journal of Virology*. – 2015. – T. 89, № 9. – C. 4818-4826.
95. Selvaraju S. B., Selvarangan R. Evaluation of Three Influenza A and B Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays and a New 2009 H1N1 Assay for Detection

of Influenza Viruses // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – T. 48, № 11. – C. 3870-3875.

96. Manuguerra J. C., Hannoun C., Saenz M. D., Villar E., Cabezas J. A. Seroepidemiologic survey of influenza-C virus-infection in Spain // *European Journal of Epidemiology*. – 1994. – T. 10, № 1. – C. 91-94.

97. Hause B. M., Collin E. A., Liu R. X., Huang B., Sheng Z. Z., Lu W. X., Wang D., Nelson E. A., Li F. Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family // *Mbio*. – 2014. – T. 5, № 2.

98. Hause B. M., Ducatez M., Collin E. A., Ran Z. G., Liu R. X., Sheng Z. Z., Armien A., Kaplan B., Chakravarty S., Hoppe A. D., Webby R. J., Simonson R. R., Li F. Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses // *Plos Pathogens*. – 2013. – T. 9, № 2.

99. Zhai S. L., Zhang H., Chen S. N., Zhou X., Lin T., Liu R. X., Lv D. H., Wen X. H., Wei W. K., Wang D., Li F. Influenza D Virus in Animal Species in Guangdong Province, Southern China // *Emerging Infectious Diseases*. – 2017. – T. 23, № 8. – C. 1392-1396.

100. Foni E., Chiapponi C., Baioni L., Zanni I., Merenda M., Rosignoli C., Kyriakis C. S., Luini M. V., Mandola M. L., Bolzoni L., Nigrelli A. D., Faccini S. Influenza D in Italy: towards a better understanding of an emerging viral infection in swine // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7.

101. Snoeck C. J., Oliva J., Pauly M., Losch S., Wildschutz F., Muller C. P., Hubschen J. M., Ducatez M. F. Influenza D Virus Circulation in Cattle and Swine, Luxembourg, 2012-2016 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2018. – T. 24, № 7. – C. 1388-1389.

102. Gorin S., Fablet C., Queguiner S., Barbier N., Paboeuf F., Herve S., Rose N., Simon G. Assessment of Influenza D Virus in Domestic Pigs and Wild Boars in France: Apparent Limited Spread within Swine Populations Despite Serological Evidence of Breeding Sow Exposure // *Viruses-Basel*. – 2020. – T. 12, № 1.

103. Kyriakis C. S., Rose N., Foni E., Maldonado J., Loeffen W. L. A., Madec F., Simon G., Van Reeth K. Influenza A virus infection dynamics in swine farms in Belgium, France, Italy and Spain, 2006-2008 // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – T. 162, № 2-4. – C. 543-550.

104. Poljak Z., Carman S., McEwen B. Assessment of seasonality of influenza in swine using field submissions to a diagnostic laboratory in Ontario between 2007 and 2012 // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2014. – T. 8, № 4. – C. 482-492.

105. Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza-A viruses // *Microbiological Reviews*. – 1992. – T. 56, № 1. – C. 152-179.

106. Munster V. J., Baas C., Lexmond P., Waldenstrom J., Wallensten A., Fransson T., Rimmelzwaan G. F., Beyer W. E. P., Schutten M., Olsen B., Osterhaus A., Fouchier R. A. M. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of

influenza A viruses in wild migratory birds // *Plos Pathogens*. – 2007. – T. 3, № 5. – C. 630-638.

107. Brockwell-Staats C., Webster R. G., Webby R. J. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1) // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2009. – T. 3, № 5. – C. 207-213.

108. Brown I. H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs // *Veterinary Microbiology*. – 2000. – T. 74, № 1-2. – C. 29-46.

109. Kuntz-Simon G., Madec F. Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential // *Zoonoses and Public Health*. – 2009. – T. 56, № 6-7. – C. 310-325.

110. Simon G., Larsen L. E., Durrwald R., Foni E., Harder T., Van Reeth K., Markowska-Daniel I., Reid S. M., Dan A., Maldonado J., Huovilainen A., Billinis C., Davidson I., Aguerro M., Vila T., Herve S., Breum S. O., Chiapponi C., Urbaniak K., Kyriakis C. S., Brown I. H., Loeffen W., Consortium E. European Surveillance Network for Influenza in Pigs: Surveillance Programs, Diagnostic Tools and Swine Influenza Virus Subtypes Identified in 14 European Countries from 2010 to 2013 // *Plos One*. – 2014. – T. 9, № 12.

111. Cappuccio J., Dibarbora M., Lozada I., Quiroga A., Olivera V., Dangelo M., Perez E., Barrales H., Perfumo C., Pereda A., Perez D. R. Two years of surveillance of influenza A virus infection in a swine herd. Results of virological, serological and pathological studies // *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*. – 2017. – T. 50. – C. 110-115.

112. Rogers G. N., Paulson J. C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin // *Virology*. – 1983. – T. 127, №2. – C. 361-373.

113. Ito T., Couceiro J., Kelm S., Baum L. G., Krauss S., Castrucci M. R., Donatelli I., Kida H., Paulson J. C., Webster R. G., Kawaoka Y. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential // *Journal of Virology*. – 1998. – T. 72, № 9. – C. 7367-7373.

114. Ito T., Kawaoka Y. Host-range barrier of influenza A viruses // *Veterinary Microbiology*. – 2000. – T. 74, № 1-2. – C. 71-75.

115. Scholtissek C., Burger H., Kistner O., Shortridge K. F. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses // *Virology*. – 1985. – T. 147, № 2. – C. 287-294.

116. Kida H., Ito T., Yasuda J., Shimizu Y., Itakura C., Shortridge K. F., Kawaoka Y., Webster R. G. potential for transmission of avian influenza-viruses to PIGS // *Journal of General Virology*. – 1994. – T. 75. – C. 2183-2188.

117. Gracia J. C. M., Van den Hoecke S., Saelens X., Van Reeth K. Effect of serial pig passages on the adaptation of an avian H9N2 influenza virus to swine // *Plos One*. – 2017. – T. 12, № 4.

118. Nelson M. I., Vincent A. L. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface // *Trends in Microbiology*. – 2015. – T. 23, № 3. – C. 142-153

119. Mena I., Nelson M. I., Quezada-Monroy F., Dutta J., Cortes-Fernandez R., Lara-Puente J. H., Castro-Peralta F., Cunha L. F., Trovao N. S., Lozano-Dubernard B., Rambaut A., van Bakel H., Garcia-Sastre A. Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico // *Elife*. – 2016. – T. 5.
120. Smith G. J. D., Vijaykrishna D., Bahl J., Lycett S. J., Worobey M., Pybus O. G., Ma S. K., Cheung C. L., Raghwani J., Bhatt S., Peiris J. S. M., Guan Y., Rambaut A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic // *Nature*. – 2009. – T. 459, № 7250. – C. 1122-U107.
121. Garten R. J., Davis C. T., Russell C. A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W. M., Xu X. Y., Skepner E., Deyde V., Okomo-Adhiambo M., Gubareva L., Barnes J., Smith C. B. Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans // *Science*. – 2009. – T. 325, № 5937. – C. 197-201.
122. Smith G. J. D., Bahl J., Vijaykrishna D., Zhang J. X., Poon L. L. M., Chen H. L., Webster R. G., Peiris J. S. M., Guan Y. Dating the emergence of pandemic influenza viruses // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – T. 106, № 28. – C. 11709-11712.
123. Nelson M. I., Worobey M. Origins of the 1918 Pandemic: Revisiting the Swine "Mixing Vessel" Hypothesis // *American Journal of Epidemiology*. – 2018. – T. 187, № 12. – C. 2498-2502.
124. Webby R. J., Rossow K., Erickson G., Sims Y., Webster R. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population // *Virus Research*. – 2004. – T. 103, № 1-2. – C. 67-73.
125. Zhou N. N., Senne D. A., Landgraf J. S., Swenson S. L., Erickson G., Rossow K., Liu L., Yoon K. J., Krauss S., Webster R. G. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs // *Journal of Virology*. – 1999. – T. 73, № 10. – C. 8851-8856.
126. Vincent A. L., Ma W. J., Lager K. M., Janke B. H., Richt J. A. Swine Influenza Viruses: A North American Perspective // *Advances in Virus Research*. – 2008. – T. 72. – C. 127-154.
127. Anderson T. K., Nelson M. I., Kitikoon P., Swenson S. L., Korslund J. A., Vincent A. L. Population dynamics of cocirculating swine influenza A viruses in the United States from 2009 to 2012 // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2013. – T. 7. – C. 42-51.
128. Klenk E., Faillard H., Lempfrid H. Über die enzymatische wirkung von influenzavirus // *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*. – 1955. – T. 301, № 4-6. – C. 235-246.
129. Zambon M. C. The pathogenesis of influenza in humans // *Reviews in Medical Virology*. – 2001. – T. 11, № 4. – C. 227-241.
130. Lofgren E., Fefferman N. H., Naumov Y. N., Gorski J., Naumova E. N. Influenza seasonality: Underlying causes and modeling theories // *Journal of Virology*. – 2007. – T. 81, № 11. – C. 5429-5436.

131. Tran G.M.K. G. L., Caprani A.C. 66. Scorpion model of Influenza A(H1N1). – 2010
132. Rogers G. N., Dsouza B. L. Receptor-binding properties of human and animal H1-influenza virus isolates // *Virology*. – 1989. – T. 173, № 1. – C. 317-322.
133. Baum L. G., Paulson J. C. Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza-virus receptor specificity // *Acta Histochemica*. – 1990. – C. 35-38.
134. Suzuki Y., Ito T., Suzuki T., Holland R. E., Chambers T. M., Kiso M., Ishida H., Kawaoka Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses // *Journal of Virology*. – 2000. – T. 74, № 24. – C. 11825-11831.
135. Saunders-Hastings P. R., Krewski D. Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission // *Pathogens*. – 2016. – T. 5, № 4.
136. Castrucci M. R., Donatelli I., Sidoli L., Barigazzi G., Kawaoka Y., Webster R. G. Genetic reassortment between avian and human influenza-A viruses in italian pigs // *Virology*. – 1993. – T. 193, № 1. – C. 503-506.
137. Taubenberger J. K., Morens D. M. 1918 influenza: the mother of all pandemics // *Emerging Infectious Diseases*. – 2006. – T. 12, № 1. – C. 15-22.
138. H. F. W. Statistics of Influenza Morbidity: With Special Reference to Certain Factors in Case Incidence and Case Fatality // *Public Health Reports (1896-1970)*. – 1920. – T. 35. – C. 584-597.
139. Burnet F. M., Clark E. A survey of the last 50 years in the light of modern work on the virus of epidemic influenza: monographs from the Walter and Eliza Hall Institute of Research in Pathology and Medicine. – Melbourne, 1942. – T. 4. – c. 118.
140. Reid A. H., Fanning T. G., Hultin J. V., Taubenberger J. K. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1999. – T. 96, № 4. – C. 1651-1656.
141. Boulton M. L., Wallace R. B. Maxey-Rosenau-Last Public Health and Preventive Medicine. – 16 Edition. – McGraw Hill / Medical, 1980. – 2128 c.
142. Crosby A. W. America's forgotten pandemic: The influenza of 1918. – 2nd edition. - Cambridge University, 2003. – 356 c.
143. Worobey M., Han G. Z., Rambaut A. Genesis and pathogenesis of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – T. 111, № 22. – C. 8107-8112.
144. Taubenberger J. K., Reid A. H., Fanning T. G. The 1918 influenza virus: A killer comes into view // *Virology*. – 2000. – T. 274, № 2. – C. 241-245.
145. Tumpey T. M., Garcia-Sastre A., Taubenberger J. K., Palese P., Swayne D. E., Basler C. F. Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – T. 101, № 9. – C. 3166-3171.
146. Gorman O. T., Bean W. J., Kawaoka Y., Donatelli I., Guo Y. J., Webster R. G. Evolution of influenza-a virus nucleoprotein genes - implications for the origins of

H1N1 human and classical swine viruses // *Journal of Virology*. – 1991. – T. 65, № 7. – C. 3704-3714.

147. Reid A. H., Taubenberger J. K. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma // *Journal of General Virology*. – 2003. – T. 84. – C. 2285-2292.

148. Sheerar M. G., Easterday B. C., Hinshaw V. S. Antigenic conservation of H1N1 swine influenza-viruses // *Journal of General Virology*. – 1989. – T. 70. – C. 3297-3303.

149. Vincent A. L., Lager K. M., Ma W. J., Lekcharoensuk P., Gramer M. R., Loiacono C., Richt J. A. Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses from the United States // *Veterinary Microbiology*. – 2006. – T. 118, № 3-4. – C. 212-222.

150. Lemey P., Rambaut A., Bedford T., Faria N., Bielejec F., Baele G., Russell C. A., Smith D. J., Pybus O. G., Brockmann D., Suchard M. A. Unifying Viral Genetics and Human Transportation Data to Predict the Global Transmission Dynamics of Human Influenza H3N2 // *Plos Pathogens*. – 2014. – T. 10, № 2.

151. Russell C. A., Jones T. C., Barr I. G., Cox N. J., Garten R. J., Gregory V., Gust I. D., Hampson A. W., Hay A. J., Hurt A. C., de Jong J. C., Kelso A., Klimov A. I., Kageyama T., Komadina N., Lapedes A. S., Lin Y. P., Mosterin A., Obuchi M., Odagiri T., Osterhaus A., Rimmelzwaan G. F., Shaw M. W., Skepner E., Stohr K., Tashiro M., Fouchier R. A. M., Smith D. J. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses // *Science*. – 2008. – T. 320, № 5874. – C. 340-346.

152. Kawaoka Y., Krauss S., Webster R. G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza-a viruses in the 1957 and 1968 pandemics // *Journal of Virology*. – 1989. – T. 63, № 11. – C. 4603-4608.

153. Lam T. T. Y., Zhou B. P., Wang J., Chai Y. J., Shen Y. Y., Chen X. C., Ma C., Hong W. S., Chen Y., Zhang Y. J., Duan L., Chen P. W., Jiang J. F., Zhang Y., Li L. F., Poon L. L. M., Webby R. J., Smith D. K., Leung G. M., Peiris J. S. M., Holmes E. C., Guan Y., Zhu H. C. Dissemination, divergence and establishment of H7N9 influenza viruses in China // *Nature*. – 2015. – T. 522, № 7554. – C. 102-265.

154. Taubenberger J. K., Morens D. M. Pandemic influenza - including a risk assessment of H5N1 // *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*. – 2009. – T. 28, № 1. – C. 187-202.

155. Lam T. T. Y., Zhu H. C., Wang J., Smith D. K., Holmes E. C., Webster R. G., Webby R., Peiris J. M., Guan Y. Reassortment Events among Swine Influenza A Viruses in China: Implications for the Origin of the 2009 Influenza Pandemic // *Journal of Virology*. – 2011. – T. 85, № 19. – C. 10279-10285.

156. Poonsuk S., Sangthong P., Petcharat N., Lekcharoensuk P. Genesis and genetic constellations of swine influenza viruses in Thailand // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – T. 167, № 3-4. – C. 314-326.

157. Vijaykrishna D., Smith G. J. D., Pybus O. G., Zhu H. C., Bhatt S., Poon L. L. M., Riley S., Bahl J., Ma S. K., Cheung C. L., Perera R., Chen H. L., Shortridge K. F., Webby R. J., Webster R. G., Guan Y., Peiris J. S. M. Long-term evolution and

transmission dynamics of swine influenza A virus // *Nature*. – 2011. – T. 473, № 7348. – C. 519-U263.

158. Janke B. H. Influenza A Virus Infections in Swine Pathogenesis and Diagnosis // *Veterinary Pathology*. – 2014. – T. 51, № 2. – C. 410-426.

159. Selvaraju S. B., Selvarangan R. Evaluation of Three Influenza A and B Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays and a New 2009 H1N1 Assay for Detection of Influenza Viruses // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – T. 48, № 11. – C. 3870-3875.

160. Guo Y. J., Kuo Y. C., Jin F. G., Wang P., Wang M., Zhu J. M., Chu C. M. Isolation of influenza-c virus from pigs and experimental-infection of pigs with influenza-C virus // *Journal of General Virology*. – 1983. – T. 64, № JAN. – C. 177-182.

161. Anderson, T. K., Chang, J., Arendsee, Z. W., Venkatesh, D., Souza, C. K., Kimble, J. B., Lewis, N. S., Davis, C. T., & Vincent, A. L. Swine Influenza A Viruses and the Tangled Relationship with Humans // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2021. – T. 11, №3. – C. 1-24.

162. Shinde V., Bridges C. B., Uyeki T. M., Shu B., Balish A., Xu X. Y., Lindstrom S., Gubareva L. V., Deyde V., Garten R. J., Harris M., Gerber S., Vagasky S., Smith F., Pascoe N., Martin K., Dufficy D., Ritger K., Conover C., Quinlisk P., Klimov A., Bresee J. S., Finelli L. Triple-Reassortant Swine Influenza A (H1) in Humans in the United States, 2005-2009 // *New England Journal of Medicine*. – 2009. – T. 360, № 25. – C. 2616-2625.

163. Gambaryan A. S., Marinina V. P., Tuzikov A. B., Bovin N. V., Rudneva I. A., Sinitsyn B. V., Shilov A. A., Matrosovich M. N. Effects of host-dependent glycosylation of hemagglutinin on receptor-binding properties of H1N1 human influenza A virus grown in MDCK cells and in embryonated eggs // *Virology*. – 1998. – T. 247, № 2. – C. 170-177.

164. Gallagher P., Henneberry J., Wilson I., Sambrook J., Gething M. J. Addition of carbohydrate side-chains at novel sites on influenza-virus hemagglutinin can modulate the folding, transport, and activity of the molecule // *Journal of Cell Biology*. – 1988. – T. 107, № 6. – C. 2059-2073.

165. Schulze I. T. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin // *Journal of Infectious Diseases*. – 1997. - T. 176, №1. – C. 24 - 28.

166. Drummer H. E., Jackson D. C., Brown L. E. Modulation of CD4+ T-cell recognition of influenza hemagglutinin by carbohydrate side-chains located outside a T-cell determinant // *Virology*. – 1993. – T. 192, № 1. – C. 282-289.

167. Xu R., Ekiert D. C., Krause J. C., Hai R., Crowe J. E., Wilson I. A. Structural Basis of Preexisting Immunity to the 2009 H1N1 Pandemic Influenza Virus // *Science*. – 2010. – T. 328, № 5976. – C. 357-360.

168. Lowen A. C., Mubareka S., Steel J., Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature // *Plos Pathogens*. – 2007. – T. 3, № 10. – C. 1470-1476.

169. Steel J., Palese P., Lowen A. C. Transmission of a 2009 Pandemic Influenza Virus Shows a Sensitivity to Temperature and Humidity Similar to That of an H3N2 Seasonal Strain // *Journal of Virology*. – 2011. – T. 85, № 3. – C. 1400-1402.
170. Song J. M., Van Rooijen N., Bozja J., Compans R. W., Kang S. M. Vaccination inducing broad and improved cross protection against multiple subtypes of influenza A virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. – 2011. – T. 108, №2. – C. 757-761.
171. Howden K. J., Brockhoff E. J., Caya F. D., McLeod L. J., Lavoie M., Ing J. D., Bystrom J. M., Alexandersen S., Pasick J. M., Berhane Y., Morrison M. E., Keenliside J. M., Laurendeau S., Rohonczy E. B. An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm // *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*. – 2009. – T. 50, № 11. – C. 1153-1161.
172. Weingartl H. M., Berhane Y., Hisanaga T., Neufeld J., Kehler H., Embury-Hyatt C., Hooper-McGreevy K., Kasloff S., Dalman B., Bystrom J., Alexandersen S., Li Y., Pasick J. Genetic and Pathobiologic Characterization of Pandemic H1N1 2009 Influenza Viruses from a Naturally Infected Swine Herd // *Journal of Virology*. – 2010. – T. 84, № 5. – C. 2245-2256.
173. Deng Y. M., Iannello P., Smith I., Watson J., Barr I. G., Daniels P., Komadina N., Harrower B., Wong F. Y. K. Transmission of influenza A(H1N1) 2009 pandemic viruses in Australian swine // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2012. – T. 6, № 3. – C. 42-47.
174. Sreta D., Tantawet S., Ayudhya S. N. N., Thontiravong A., Wongphatcharachai M., Lapkuntod J., Bunpaong N., Tuanudom R., Suradhat S., Vimolket L., Poovorawan Y., Thanawongnuwech R., Amonsin A., Kitikoon P. Pandemic (H1N1) 2009 Virus on Commercial Swine Farm, Thailand // *Emerging Infectious Diseases*. – 2010. – T. 16, № 10. – C. 1587-1590.
175. Trevennec K., Leger L., Lyazrhi F., Baudon E., Cheung C. Y., Roger F., Peiris M., Garcia J. M. Transmission of pandemic influenza H1N1 (2009) in Vietnamese swine in 2009-2010 // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2012. – T. 6, № 5. – C. 348-357.
176. Vincent A., Awada L., Brown I., Chen H., Claes F. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research // *Zoonoses and Public Health*. – 2014. – T. 61, № 1. – C. 4-17.
177. Chauhan R. P., Gordon M. L. A Systematic Review Analyzing the Prevalence and Circulation of Influenza Viruses in Swine Population Worldwide // *Pathogens*. – 2020. - T. 9, № 355. – C. 1-54.
178. Li Y., Robertson I. The epidemiology of swine influenza // *Animal diseases*. - 2021. – T. 1, №1 (21). – C. 1-14.
179. Zell R., Groth M., Krumbholz A., Lange J., Philipps A., Dürrwald R. (2020). Cocirculation of Swine H1N1 Influenza A Virus Lineages in Germany // *Viruses*. – 2020. – T. 12, №7. – C. 1-15.

180. Киселев О.И. Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1V-2009. - М.: Димитрейд График Групп, 2011. - 164 с.
181. Klivleyeva N.G., Saktaganov N.T., Glebova T.I. Detection of Influenza A(H1N1) Viruses in Humans and Pigs in the Northern Kazakhstan during 2014-2016 // Матер.международ. конф. «Influenza 2018: Centenary of the 1918 Pandemic». – Лондон, 2018. - С. 38.
182. <http://ppdp-spb.com/>. 06.06.2022
183. Клинический протокол диагностики и лечения ГРИПП и ОРВИ: одобрен Объединенной комиссией по качеству медицинских услуг МЗ РК 19 апреля 2019 года, №63. <https://diseases.medelement.com/disease/16085>. 30.05.2022.
184. МЗ РК Государственный реестр лекарственных средств и медицинских изделий. http://register.ndda.kz/category/search_prep. 30.05.22.
185. Казахстанский национальный лекарственный формуляр. <http://www.rcrz.kz>. 30.05.2022.
186. Leuwerke B., Kitikoon P., Evans R., Thacker E. Comparison of three serological assays to determine the cross-reactivity of antibodies from eight genetically diverse U.S. Swine influenza viruses // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2008. - Т. 20. – С. 426-432.
187. Мукашева Е.А., Колобухина Л.В., Меркулова Л.В. и др. Серодиагностика в надзоре за циркуляцией вирусов гриппа в период пандемии, вызванной А(Н1N1)pdm09 // Вопросы вирусологии. - 2015. – Т. 60, № 6. - С. 19-24.
188. <https://www.thermofisher.com/kz/en/home/brands/invitrogen.html>. 09.06.2022
189. <https://www.sigmaaldrich.com/KZ/en>. 09.06.2022
190. Карышева А. Ф., Сюрин В. Н. Руководство по практической вирусологии: справочное пособие. – Кишинева: Штиинца, 1980. – 212 с.
191. Методические рекомендации. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация: утв. 18 апреля 2006 года, №0100/4430-06-34. <https://docs.cntd.ru/document/420214503>. 27.05.2022
192. Ильичева Т. Н., Нетесов С. В., Гуреев В. Н. Практикум по микробиологии «Вирусы гриппа»: методическое пособие часть II. – Новосибирск, 2012. – 76 с.
193. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. – Geneva: World Health Organization, 2011. – 140 с.
194. <https://www.interlabservice.ru/about/amplisens/>. 06.06.2022
195. Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R. G., Perez D. R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses // Archives of Virology. – 2001. – Т. 146, № 12. – С. 2275-2289.
196. Бутвиловский В.Э., Бутвиловский А.В., Давыдов В.В., Черноус Е.А. Молекулярная эволюция: сборник задач. – Минск: БГМУ, 2007. – 24с.
197. Методы определения характера аминокислотных замен: учеб.-метод. пособие / А. В. Бутвиловский, Е. А. Черноус. – Минск : БГМУ, 2008. – 28 с.

198. Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M., Jansen C. L., Wertheimvandillen P. M. E., Vandernoordaa J. RAPID AND SIMPLE METHOD FOR PURIFICATION OF NUCLEIC-ACIDS // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1990. – Т. 28, № 3. – С. 495-503.
199. Иммунологическая диагностика вирусных инфекций / под ред. Т. В. Перадзе, П. Халонена. – Совм. изд. СССР – Финляндия. – М.: Медицина, 1985. – 302 с.
200. Дерябин П. Г., Бутенко А. М., Бурцева Е. И. Реакция гемагглютинации и реакция торможения гемагглютинации // В кн.: *Медицинская вирусология: руководство* / под ред. Д.К. Львова, Л.М. Алимбарова, С.В. Альховский. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – С. 312-317.
201. Reed L. J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent and points // *American Journal of Hygiene*. – 1938. – Т. 27, №3. – С. 493-497.
202. Cloud S. S., Rosenberger J. K. Characterization of nine avian paramyxoviruses // *Avian Diseases*. - 1979. - Т. 24, №1. - С. 139-152.
203. Ito T., Suzuki Y., Mitnaul L., Vines A., Kida H., Kawaoka Y. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species // *Virology*. – 1997. – Т. 227, № 2. – С. 493-499.
204. Ершов Ф. И., Тазулахова Э. Б., Наровлянский А. Н., Миронов А. Н., Меркулов В. А., Ленева И. А., Оспельникова Т. П., Васильев А. Н. Методические рекомендации по доклиническому изучению специфической противовирусной активности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова МЗ РФ. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 525-549.
205. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. – Изд. 2-е, перер. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
206. Chucholowius H.W., Rott R. A new method for purification of myxoviruses by zonal centrifugation with 2 different density gradients // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1973. – Т. 140. - С. 245-247.
207. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry* - 1976. – Т. 72. – С. 248-254.
208. Гланц С. Медико-биологическая статистика. - М.: Практика, 1998. - 459 с.
209. Статистический анализ в MS Excel <https://statanaliz.info/>
210. Қалқожаева М.Қ., Сактаганов Н.Т., Баймухаметова А.М. Циркуляция свиного гриппа в Казахстане в 2017-2018 гг. // Межрегион.науч.-практич.конф. «Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики». – Екатеринбург: Юника, 2018. - С. 37-38.
211. Baiseit S.B., Ongarbayeva N.S., Kalkozhayeva M.K. Circulation of Influenza Viruses among humans and swine in the regions of Northern and Western Kazakhstan in 2017 – 2018 // Матер.междунар.конф. «Молекулярные основы

эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций». - Санкт-Петербург, 2018. - С. 521.

212. Онгарбаева Н.С., Сактаганов Н.Т., Калкожаева М.К. Циркуляция вируса гриппа А/Н1N1 среди людей и свиней в северном и западном Казахстане в 2017 - 2018 гг. // The central Asian scientific-practical Journal on Public Health. - 2018.- Т. 2, №59. - С. 112-115.

213. Онгарбаева Н.С., Сактаганов Н.Т., Кливлеева Н.Г. Обнаружение возбудителей вирусов гриппа у свиней в Северном Казахстане (2014-2019 гг.) // The central Asian scientific-practical Journal on Public Health. - 2019. – Т. 3. - С. 58-62.

214. Klivleyeva N.G., Ongarbayeva N.S., Saktaganov N.T. Circulation of influenza viruses among humans and swine in the territory of Kazakhstan during 2017–2018 // Bulletin of National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. - 2019. - Т. 2, № 378. - С. 6-13.

215. Klivleyeva N., Ongarbayeva N., Saktaganov N. Monitoring of influenza A virus circulating in swine population in the northern and western regions of Kazakhstan in 2018 // Конгресс «10th Edition of Options for the Control of Influenza». – Сингапур, 2019. - С. 477.

216. Баймухаметова А.М., Онгарбаева Н.С., Глебова Т.И. Вирусы гриппа А/Н1N1, циркулирующие среди свиней в различных регионах Казахстана в 2019 году // Матер.междунар.науч.-прак.конф. «Современные вызовы для биотехнологии, ветеринарии и медицины». - Гвардейский, 2020. - С. 54-58.

217. Онгарбаева Н.С., Кливлеева Н.Г., Сактаганов Н.Т. Циркуляция вируса гриппа в популяциях свиней в различных регионах Республики Казахстан (2018-2019 гг.) // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – Алматы, 2019. – Т. 3, № 80. - С. 70-80.

218. Пат. 34782 Республика Казахстан. Штамм вируса гриппа Н1N1 А/свинья/Петропавловск/03/18, используемый для приготовления диагностических препаратов / Кливлеева Н.Г., Онгарбаева Н.С.; заявитель и патентообладатель ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии». - №0736.1/2019; заявл. 08.10.2019; опубл. 09.04.2021.

219. Klivleyeva N.G., Ongarbayeva N.S., Korotetskiy I.S. Coding-Complete Genome Sequence of Swine Influenza Virus Isolate A/Swine/Karaganda/04/2020 (H1N1) from Kazakhstan // Microbiology resource announcements. - 2021. – Т. 10, №39. – С. 1-3.

220. Бутвиловский В.Э., Бутвиловский А.В., Давыдов В.В., Черноус Е.А. Молекулярная эволюция: сборник задач. – Минск: БГМУ, 2007. – 24с.

221. Martin D. P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes // Virus Evolution. – 2015. - Т. 1, №1. – С. 1-5.

222. Сактаганов Н.Т., Кливлеева Н.Г., Онгарбаева Н.С. Study on antigenic relationships and biological properties of swine influenza A/H1N1 virus strains isolated in northern Kazakhstan in 2018 // Сельскохозяйственная биология. - Москва, 2020. – Т. 2, № 55. - С. 355-363.

223. Онгарбаева Н.С., Сактаганов Н.Т., Глебова Т.И. Isolation and characteristics of influenza viruses circulating among swine populations in Kazakhstan during 2018–2019 // Вестник Карагандинского университета. Серия «Биология. Медицина. География». - Караганда, 2022. - Т. 1, №105. - С. 70-77.
224. Сактаганов Н.Т., Кливлеева Н.Г., Глебова Т.И. Характеристика биологических свойств изолятов вируса гриппа свиней А/Н1N1, выделенных в Актюбинской области в 2014 году // Ветеринария. - 2019. – Т. 2. - С. 21-25.
225. Онгарбаева Н.С., Кливлеева Н.Г., Глебова Т.И. Новый штамм вируса гриппа Н1N1 А/свинья/Костанай/23/14, используемый для приготовления диагностических препаратов // Новости науки Казахстана (научно-технический журнал). - 2020. – Т. 3, № 145. - С. 45-54.
226. Глебова Т.И., Кливлеева Н.Г., Онгарбаева Н.С. Новый штамм вируса гриппа Н1N1 А/свинья/Костанай/06/12, используемый для приготовления диагностических препаратов // Новости науки Казахстана (научно-технический журнал). - 2019. – Т. 2, № 140. - С. 90-98.
227. Cotter C. R., Jin H., Chen Z. Y. A Single Amino Acid in the Stalk Region of the H1N1pdm Influenza Virus HA Protein Affects Viral Fusion, Stability and Infectivity // Plos Pathogens. – 2014. – Т. 10, № 1.
228. Yang G. H., Ojha C. R., Russell C. J. Relationship between hemagglutinin stability and influenza virus persistence after exposure to low pH or supraphysiological heating // Plos Pathogens. – 2021. – Т. 17, № 9.
229. Смородинцев А.А. Грипп и его профилактика. – Ленинград, 1984. – 383 с.
230. Шварцман Я.С., Шуратов И.Х., Найхин А.Н., Исмагулов А.Г. Иммунология гриппа. - Алма-Ата: Наука, 1985. – 144 с.
231. Шуратов И.Х., Саятов М.Х. Факторы и механизмы противовирусного иммунитета. - Алма-Ата: Наука, 1985. – 168 с.
232. Ananthanarayan, R., Paniker, C.K. Non-specific inhibitors of influenza viruses in normal sera // Bulletin of the World Health Organization. – Т. 22 №3-4. – С. 409-419.
233. Skarlupka A. L., Ross T. M. Inherent Serum Inhibition of Influenza Virus Neuraminidases // Frontiers in Veterinary Science. – 2021. – Т. 8.
234. Boltz D. A., Aldridge J. R., Webster R. G., Govorkova E. A. Drugs in development for influenza // Drugs. - 2010. - Т. 70, № 11. - С. 1349-1362.
235. De Clercq E. Emerging antiviral drugs // Expert Opinion. Emerging Drugs. - 2008. – Т. 13, № 3. - С. 393-416.
236. Hussain M., Galvin H. D., Haw T. Y., Nutsford A. N., Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management // Infection and Drug Resistance. – 2017. – Т. 10. – С. 121-134.
237. Holmes E. C., Hurt A. C., Dobbie Z., Clinch B., Oxford J. S., Piedra P. A. Understanding the Impact of Resistance to Influenza Antivirals // Clinical Microbiology Reviews. – 2021. – Т. 34, № 2.

238. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2020. – Т. 39, № 7. – С. 1201-1208.
239. Renaud C., Kuypers J., Englund J.A. Emerging oseltamivir resistance in seasonal and pandemic influenza A/H1N1 // *Journal of clinical virology*. – 2011. – Т. 52. – С. 70-78.
240. Деева Э. Г., Киселев О. И. Современные противовирусные химиопрепараты и принципы химиотерапии при гриппе // В кн.: Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика / под ред. О. И. Киселева, Л. М. Цыбаловой, В. И. Покровского. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2012. – С. 315-355.
241. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Максимов В. А., Бондарев В. П. Оценка токсичности неспецифических медицинских противовирусных средств, предназначенных для профилактики и лечения опасных и особо опасных вирусных инфекций // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2009. – Т. 54, №3-4. – С. 11-14
242. Tare D. S., Pawar S. D. Use of embryonated chicken egg as a model to study the susceptibility of avian influenza H9N2 viruses to oseltamivir carboxylate // *Journal of Virological Methods*. – 2015. – Т. 224. – С. 67-72.
243. Табынов К.К., Мамадалиев С.М., Азанбекова М.А., Мамбеталиев М. Антигенные взаимосвязи высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц А/Н5N1, выделенных на территории Республики Казахстан в 2005-2006 годы // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. - 2009. - №4 (4). – С. 8-11.
244. Cai M. K., Huang J. M., Bu D. X., Yu Z. Q., Fu X. L. Molecular evolution of H1N1 swine influenza in Guangdong, China, 2016-2017 // *Infection Genetics and Evolution*. – 2018. – Т. 60. – С. 103-108.
245. Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. – Москва, 1971. - 343 с.
246. Флинт Д.М. Некоторые основные аспекты процесса сублимационной сушки. – М.: Мир, 1981. – С. 1-13.
247. Долинов К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов. – М.: Медицина, 1968. - 196 с.
248. Фадеева Л.Л. и др. Основные принципы консервации вирусов методом лиофилизации. - Москва, 2004. - 59 с.
249. Пушкарь В. Г., Новицкая И. В., Кулаков М. Я., Павлова К. А., Степурина А. М. Усовершенствование процесса лиофильного высушивания иммунобиологических препаратов на современном оборудовании // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. – 2011. – Т. 4, №40. – С. 65-68.
250. Похиленко В. Д., Баранов А. М., Детушев К. В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. – 2009. – Т. 4, №12. – С. 99-121.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
БҒЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТЕРЛІГІ
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ
«БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУІПСІЗДІК
ПРОБЛЕМАЛАРЫНЫҢ ҒЫЛЫМИ-
ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ»
республикалық мемлекеттік кәсіпорыны



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КОМИТЕТ НАУКИ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»
республиканское государственное предприятие

080409, Жамбылская область, Кордай ауданы,
Гвардейский к.т.к., тел.: 8/72636/7-22-28,
e-mail: ribsp@biosafety.kz

080409, Жамбылская область, Кордайский район,
п.г.т. Гвардейский, тел.: 8/72636/7-22-28,
e-mail: ribsp@biosafety.kz

15 04 2018 ж.
№ 08-051287

СПРАВКА

о депонировании штамма

«А/свинья/Петропавловск/03/18» вируса гриппа А/Н1N1

Авторы: Кливлеева Н.Г., Глебова Т.И., Шаменова М.Г.,
Лукманова Г.В., Сактаганов Н.Т., Онгарбаева Н.С., Байсейіт С.Б.,
Қалқожаева М.Қ., Баймухаметова А.М., Коротецкий И.С., Мустафин М.К.
(ТОО « Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»)

Штамм «А/свинья/Петропавловск/03/18» вируса гриппа А/Н1N1
относится к семейству *Orthomyxoviridae* роду *Influenza virus A*, серотипу
Н1. Выделенный штамм предназначен для изготовления диагностических
препаратов.

Дата депонирования 27.03.2019 г., штамму А/свинья/Петропавловск/03/18»
вируса гриппа присвоен регистрационный номер М-3-19/D Коллекции
микроорганизмов Республиканского государственного предприятия
«Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан
(080409, Жамбылская область, Кордайский район, п.г.т. Гвардейский. Тел.:
+7(72636) 7-22-28).

Генеральный директор

К. Закарья

Заведующий лабораторией
коллекции микроорганизмов

М. Мамбеталиев

010082

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

