

Оригинальная статья / Original article
УДК 578.4
DOI: 10.18470/1992-1098-2021-1-45-52

Биологические свойства вируса гриппа H6N8-субтипа, выделенного от диких птиц на юге Западной Сибири

Синьсинь Ли^{1,2}, Никита А. Дубовицкий¹, Анастасия А. Дёрко^{1,2}, Александра В. Глущенко¹, Иван А. Соболев¹, Алексей В. Друзяка³, Марьям М. Меджидова⁴, Эльмира М. Мусинова⁴, Кирилл А. Шаршов¹, Александр М. Шестопалов^{1,5}

¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴Дагестанский государственный медицинский университет, Махачкала, Россия

⁵Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

Контактное лицо

Синьсинь Ли, аспирант, Новосибирский национальный исследовательский государственный университет; 630090 Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2. Тел. +79232210977
Email xinxinli@mail.ru
ORCID <https://orcid.org/0000-0003-1855-8646>

Формат цитирования

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

Получена 16 декабря 2020 г.
Прошла рецензирование 11 января 2021 г.
Принята 23 января 2021 г.

Резюме

Цель. Исследовать молекулярно-биологические свойства вируса гриппа H6N8-субтипа.

Материал и методы. В 2016 году на юге Западной Сибири был проведён ежегодный сбор биологического материала от диких водоплавающих птиц. Культивирование вирусов гриппа А из клоакальных смывов птиц проводили в системе развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) путем 3 последовательных пассажей. Наличие вируса в аллантоисной жидкости определяли в реакции гемагглютинации (РГА). Первичную идентификацию вируса гриппа осуществляли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Субтипирование проводили при помощи массового параллельного секвенирования.

Результаты. Впервые в России выделен вирус гриппа H6N8-субтипа. Филогенетический анализ генов гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA) штамма A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8), полученного в ходе исследования, показал его принадлежность к Евразийским генетическим линиям вируса птичьего гриппа. В результате филогенетического анализа гена НА было установлено, что полученный изолят является близкородственным штамму A/duck/Bangladesh/25767/2015(H6N1), выделенному от утки в Бангладеш.

Заключение. Штамм A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) был выделенный от серой утки (*Anas strepera*) в водных угодьях юга Западной Сибири, которые находятся на путях миграции и гнездования многих видов птиц. Субтип H6N8 способен распространяться между дикими водоплавающими и домашними птицами, увеличивая вероятность рекомбинации и передачи. В этой связи усиление эпизоотологического надзора за птичьим гриппом субтипа H6 среди диких птиц на территории юга Западной Сибири остается принципиально важным.

Ключевые слова

Вирус гриппа А, субтип H6N8, дикие птицы, ген НА, юг Западной Сибири, штамм.

Biological characteristics of influenza virus subtype H6N8 isolated from wild birds in the south of Western Siberia

Xinxin Li^{1,2}, Nikita A. Dubovitskiy¹, Anastasiya A. Derko^{1,2}, Alexandra V. Glushchenko¹, Ivan A. Sobolev¹, Aleksey V. Druzyaka³, Maryam M. Medzhidova⁴, Elmira M. Musinova⁴, Kirill A. Sharshov¹ and Alexander M. Shestopalov^{1,5}

¹Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴Dagestan State Medical University, Makhachkala, Russia

⁵Dagestan State University, Makhachkala, Russia

Principal contact

Xinxin Li, graduate student, Novosibirsk State University; 2 Pirogova St, Novosibirsk, Russia 630090.

Tel. +79232210977

Email xinxinli@mail.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0003-1855-8646>

How to cite this article

Li X., Dubovitskiy N.A., Derko A.A., Glushchenko A.V., Sobolev I.A., Druzyaka A.V., Medzhidova M.M., Musinova E.M., Sharshov K.A., Shestopalov A.M. Biological characteristics of influenza virus subtype H6N8 isolated from wild birds in the south of Western Siberia. *South of Russia: ecology, development*. 2021, vol. 16, no. 1, pp. 45-52. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2021-1-45-52

Received 16 December 2020

Revised 11 January 2021

Accepted 23 January 2021

Abstract

Aim. The aim is to explore the molecular and biological characteristics of influenza virus subtype H6N8.

Material and Methods. Regular collecting of biological samples from wild birds was carried out in 2016 in the south of Western Siberia. Isolation of avian influenza virus strains from birds' cloacal swabs was performed using three passages in embryonated chicken eggs. Hemagglutination assay was used to detect viruses in the allantoic fluid. Type and subtype of influenza viruses were identified using reverse transcription PCR (RT-PCR).

Results. This is the first time the avian influenza virus H6N8 subtype has been isolated in Russia. Phylogenetic analysis revealed that hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) segments of A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) strain genome belonged to the Eurasian lineages of avian influenza viruses. Phylogenetic analysis showed that the HA sequence of the strain was closely related to the strain isolated from a duck in Bangladesh in 2015 (A/duck/Bangladesh/25767/2015(H6N1)).

Conclusion. Avian influenza viruses subtype H6N8 have the ability to circulate among wild waterfowl and poultry, increasing the chance of reassortment and transmission of H6 virus strains among birds. For this reason, it is of crucial importance to strengthen surveillance for avian influenza H6 subtype among wild birds in the south of Western Siberia.

Key Words

Influenza A virus, subtype H6N8, wild birds, HA gene, the south of the Western Siberia, strain.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*. На основании антигенных различий в нуклеопротеидном (NP) и матричном (M) белках вирус гриппа разделяется на три типа: А, В и С [1]. Естественным хозяином вируса гриппа А (ВГА) в основном являются дикие водоплавающие птицы. Восприимчивыми к вирусу гриппа могут быть домашние птицы, млекопитающие (таких как тюлени, тигры, кошки, лошади, свиньи, собаки) и люди [2; 3]. Именно ВГА является возбудителем, который вызывает пандемии гриппа человека и сезонные эпидемии. ВГА подразделяются на субтипы на основании различий в поверхностных гликопротеинах – гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) [4]. В соответствии с уровнем патогенности выделяют высокопатогенный грипп птиц (ВПП) и низкопатогенный грипп птиц (НПП). ВПП у домашних птиц характеризуется высокой смертностью и большим экономическим ущербом для промышленного птицеводства.

ВГА имеет широкий спектр возможностей в формировании многообразных «антигенных формул». К настоящему моменту среди птиц обнаружено 16 субтипов гемагглютинина и 9 субтипов нейраминидазы. Кроме того, два новых субтипа ВГА (H17N10 и H18N11) были выделены у летучих мышей в 2012-2013 гг. [5; 6]. Одной из основных причин широкого распространения ВГА среди птиц является массовая миграция диких водоплавающих птиц, численность которых в местах гнездования максимальна [7; 8]. Поскольку дикие водоплавающие птицы являются основными носителями вируса птичьего гриппа, это создает благоприятную основу для горизонтального распространения вируса.

Множество рек и озёр на юге Западной Сибири (долины рек Оби и Иртыша, Обь-Иртышское междуречье) находятся на путях миграции многих видов птиц. Данный район является гнездовым ареалом большого числа видов, экологически связанных с водоёмами [9]. Полученные нами ранее данные показывают, что у диких птиц, обитающих на этой территории, выделялись вирусы гриппа различных субтипов, но изоляты H6-субтипа не выявлялись. Более того, анализ доступной литературы показал, что вирус гриппа H6N8 субтипа ранее в России не выделялся. При этом вирусы гриппа с гемагглютинином H6 достаточно широко распространены в мире. Так он был впервые выделен у индейки в США в 1965 году, а затем и у диких птиц [10-14]. Позднее вирусы этого субтипа выделялись в Европе и Азии, и было показано, что они являются актуальными в системе эпизоотологического надзора [15; 16].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор материала. Сбор биологического материала (клоакальные смывы и фрагменты кишечника) осуществляли в рамках проведения мониторинга за вирусом гриппа А на территории Сибири. Материал был собран в осенние периоды 2016-2018 гг. Клоакальные смывы и фрагменты кишечника собирались в пробирки объёмом 2 мл с транспортной средой, содержащей антибиотики [17]. Пробы транспортировали в сосудах Дьюара с жидким азотом [18].

Изоляция вируса. Все работы с полученным биологическим материалом были проведены в лабораториях 2-го уровня биологической безопасности

(biosafety level-2). Выделение вируса проводили по стандартной методике путем инокуляции проб в аллантаисную полость 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) [18].

Наличие вируса гриппа птиц в аллантаисной жидкости определяли с помощью реакции гемагглютинации (РГА) [17] и методом ОТ-ПЦР в реальном времени со специфическими олигонуклеотидами [11].

Патогенность полученных изолятов определяли при помощи внутривенного теста патогенности (IVPI) на 6-ти недельных цыплятах [18]. Оценка результатов проводилась по стандартной методике, рекомендованной международным эпизоотическим бюро (ОIE): штаммы с индексом близким к 2 считаются высокопатогенными, а штаммы с индексом близким к 0 – апатогенными.

ОТ-ПЦР. Вирусная РНК выделялась из вирус-содержащей аллантаисной жидкости. Первичная идентификация вируса гриппа осуществлялась методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидов и зонда, специфичных к консервативным участкам М-гена вируса гриппа, согласно [19].

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируя результаты мониторинга вируса гриппа у диких водоплавающих птиц в 2016 году нами был выделено 12 различных изолятов вируса гриппа типа А. Анализ выделенных изолятов при помощи ОТ-ПЦР и секвенирования нового поколения (NGS) показал, что вирус, выделенный от серой утки (*Anas strepera*), имел H6 гемагглютинин. Ранее выделенные на Тайване вирусы субтипа H6N1 привели к гибели домашних птиц и заболеванию нескольких людей. Для оценки патогенности полученного нами штамма был проведён тест внутривенной патогенности (IVPI) для 6 недельных цыплят. Результаты теста показали, что за все время наблюдения (14 дней) ни одна птица не заболела и не погибла. Выделенный вирус был не патогенным и в соответствии с классификацией международного эпизоотологического бюро индекс патогенности был равен нулю (IVPI=0).

По результатам полногеномного секвенирования было установлено, что полученный штамм имеет антигенную формулу H6N8. Проведенный анализ литературных данных показал, что на территории Российской Федерации подобные субтипы вируса гриппа А ранее не выделялись.

Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности штамма ВГА субтипа H6N8, позволил понять происхождение, эволюцию, рекомбинации и распространение данного субтипа в России, а также его потенциальную эпизоотологическую и эпидемиологическую роль. Последовательности восьми сегментов генома штамма A/gadwall/Chanyu/97/2016(H6N8) сравнивались с последовательностями ВГА из международной базы данных GenBank. Результаты показали, что все сегменты содержат полные открытые рамки считывания и имеют высокую идентичность со штаммами, выделенными в Монголии, Нидерландах, Бангладеш, Китае и Грузии (табл. 1).

Согласно международной базе данных GISAID субтип H6N8 вируса гриппа птиц встречается редко. Из более чем 51 тыс. штаммов вируса гриппа А, представленных в базе данных, лишь 352 относятся к

субтипу H6N8. Кроме того, в базе данных, помимо описанного в этой работе штамма A/gadwall/Chany/97/2016, отсутствуют геномы изолятов этого субтипа вируса гриппа, обнаруженные на территории РФ. Таким образом, на данный момент штамм A/gadwall/Chany/97/2016 является единственным

выявленным на территории Российской Федерации генетическим вариантом вируса гриппа А субтипа H6N8, для которого определены и представлены в международную базу данных полные нуклеотидные последовательности всех восьми сегментов генома.

Таблица 1. Идентичность сегментов изолята A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) и штаммов вируса гриппа А из базы данных GenBank

Table 1. Identity of segments of the isolate A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8) and strains of influenza A virus from the GenBank

Регистрационный номер NCBI Accession NCBI	Название штаммов в GenBank Strain names in GenBank	Ген Gene	Идентичность Identity
LC121449	A/duck/Mongolia/769/2015(H4N6)	PB2	98.9%
KX979830	A/mallard duck/Netherlands/20/2011(H6N8)	PB1	98.5%
KY635496	A/black-tailed godwit/Bangladesh/24734/2015(H7N5)	PA	99.0%
KU143276	A/wild bird/Wuhan/CDHN15/2015(H6N2)	HA	98.1%
KX978311	A/mallard duck/Netherlands/7/2014 (H6N2)	NP	98.6%
KX978560	A/mallard duck/Netherlands/17/2011 (H3N8)	NA	98.1%
MF682900	A/mallard duck/Georgia/1/2014(H10N7)	M	98.9%
MF147859	A/mallard duck/Georgia/11/2011(H1N1)	NS	99.1%

Результаты филогенетического анализа нуклеотидной последовательности сегмента HA штамма A/gadwall/Chany/97/2016 (H6N8) указывают на его принадлежность к Евразийской генетической линии. Сегмент данного штамма оказался филогенетически близок сегменту HA вируса штамма

A/duck/Bangladesh/25767/2015 (H6N1), выделенного в 2015 г. в Бангладеш (рис. 1).

Согласно филогенетическому анализу по сегменту NA исследованный штамм находится в одной клade со штаммами A/Duck/China/R095/2014 (H6N8) и A/mallard/Jiangxi/G98/2014 (H3N8) из Китая (рис. 2).

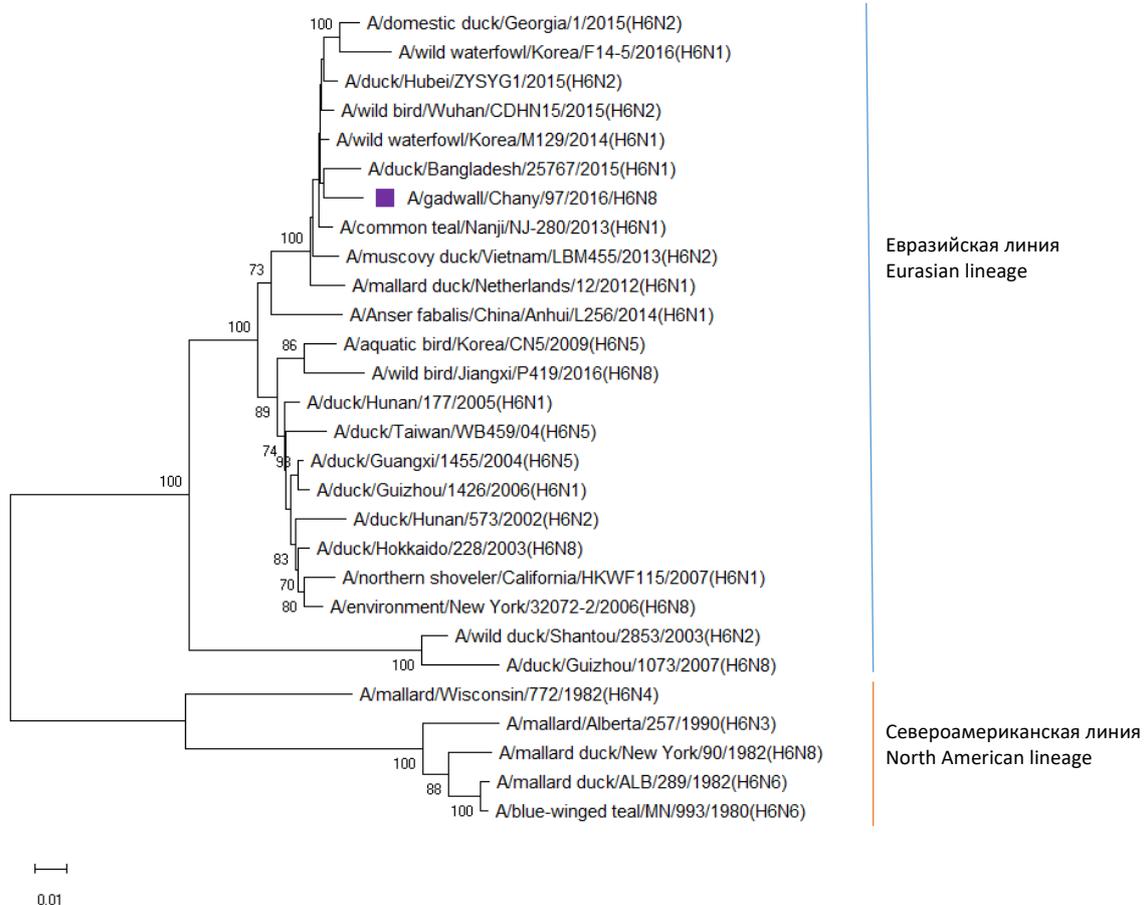


Рисунок 1. Филогенетическое дерево гена HA субтипа H6 вируса гриппа А (■ - штамм, полученный в ходе исследования)
Figure 1. Phylogenetic tree of the HA gene of the H6 subtype of the influenza A virus (■ - strain obtained in the course of the study)

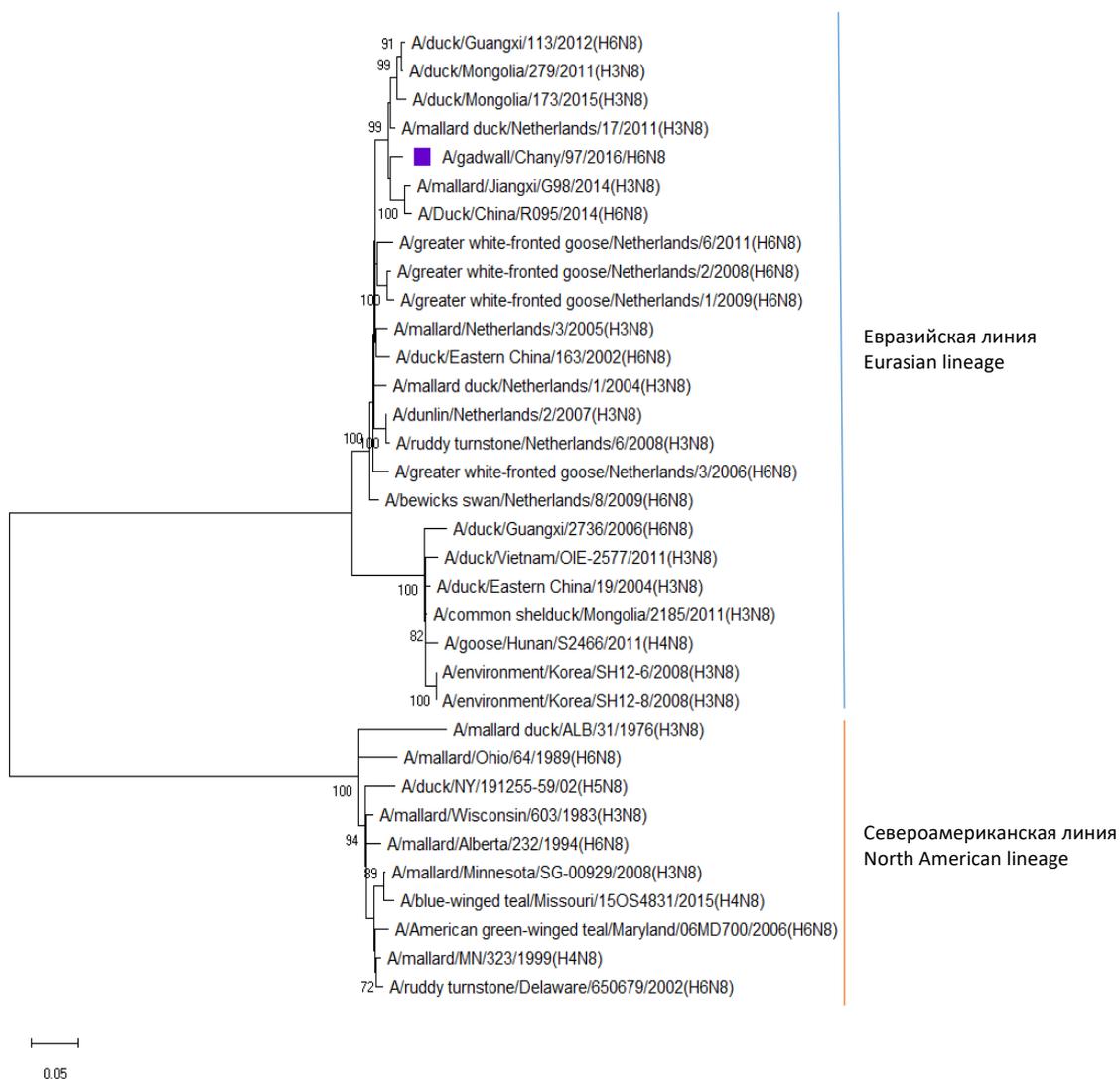


Рисунок 2. Филогенетическое дерево сегмента NA субтипа N8 вируса гриппа А (■ - штамм, полученный в ходе исследования)

Figure 2. Phylogenetic tree of the NA gene of the N8 subtype of the influenza A virus (■ - strain obtained in the course of the study)

Филогенетический анализ сегментов генома штамма A/gadwall/Chany/97/2016 (H6N8), кодирующих внутренние белки, показал принадлежность всех сегментов к евразийской генетической линии вирусов гриппа птиц.

Аминокислотная последовательность гемагглютинина исследованного штамма содержит одноосновный сайт расщепления PQIETR↓GLF, что является молекулярной характеристикой низкопатогенного вируса гриппа птиц. Домен HA1 белка NA в рецептор-связывающих сайтах имеет аминокислотные остатки Q226 и G228, которые, по данным литературы, связываются с рецепторами SA-α 2,3 птиц. Аминокислотная последовательность нейраминидазы не содержит известных замен, приводящих к снижению чувствительности вируса к ингибиторам нейраминидазы (занамивир, осельтамивир).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при проведении планового мониторинга вирусов гриппа А на юге Западной Сибири нами был выделен и охарактеризован уникальный (единственный) для России вариант гриппа птиц – субтип H6N8. Выделенный штамм был задепонирован в базу данных GISAID под номером EPI_ISL_250238 (A/gadwall/Chany/97/2016(H6N8)). Выделенный вирус оказался непатогенным. Филогенетический анализ генов, кодирующих гемагглютинин и нейраминидазу показал, что они близки к вариантам вирусов H6N8, которые циркулируют на территории Азии (Китай, Бангладеш, Тайланд). Филогенетический анализ сегментов генома, кодирующих внутренние белки, показал принадлежность всех сегментов к евразийской генетической линии вирусов гриппа А.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа поддержана грантом РФФ 20-44-07001 «Распространение РНК-вирусов птиц в Северной Азии и Азиатско-Тихоокеанском регионе: генетическое разнообразие, патогенный потенциал и прогнозирование влияния на птицеводство» и грантом РФФИ № 19-54-55004 «Циркуляция и распространение высокопатогенного вируса гриппа птиц А и других вирусов птиц между Россией и Китаем».

ACKNOWLEDGMENT

The work was supported by RNF grant 20-44-07001 "Distribution of avian RNA viruses in North Asia and the Asia-Pacific region: genetic diversity, pathogenic potential and predicting the impact on poultry farming" and RFBR grant No. 19-54-55004 "Circulation and distribution of highly pathogenic avian influenza A virus and other avian viruses between Russia and China".

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Lamb R.A., Krug R.M. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication* // Fields virology / Eds.: P.M. Howley, B.M. Fields. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996. P. 1353-1395.
- Harder T.C., Vahlenkamp T.C. Influenza virus infections in dogs and cats // *Veterinary immunology and immunopathology*. 2010. V. 134. Iss. 1-2. P. 54-60. DOI: 10.1016/j.vetimm.2009.10.009
- Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses // *Microbiological reviews*. 1992. V. 56. Iss. 1. P. 152-179.
- Gamblin S.J., Skehel J.J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins // *Journal of biological chemistry*. 2010. V. 285. Iss. 37. P. 28403-28409. DOI: 10.1074/jbc.R110.129809
- Tong S., Li Y., Rivallier P., Conrardy C., Castillo D.A., Chen L.M., Recuenco S., Ellison J.A., Davis C.T., York I.A., Turmelle A.S., Moran D., Rogers S., Shi M., Tao Y., Weil M.R., Tang K., Rowe L.A., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K.A., Cox N.J., Anderson L.J., Rupprecht C.E., Donis R.O. A distinct lineage of influenza A virus from bats // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. V. 109. Iss. 11. P. 4269-4274. DOI: 10.1073/pnas.1116200109
- Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L.M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., 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. V. 9. Iss. 10. e1003657. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003657
- Campitelli L., Ciccozzi M., Salemi M. H5N1 influenza virus evolution: a comparison of different epidemics in birds and humans (1997-2004) // *Journal of General Virology*. 2006. V. 87. Iss. 4. P. 955-960. DOI: 10.1099/vir.0.81397-0
- Smith G.J.D., Naipospos T.S.P., Nguyen T.D., Vijaykrishna D., Usman T.B., Hassan S.S., Nguyen T.V., Dao T.V., Bui N.A. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam // *Virology*. 2006. V. 350. Iss. 2. P. 258-268. DOI: 10.1016/j.virol.2006.03.048
- Юрлов К.Т. Миграции птиц в Азии. Новосибирск: Наука, 1977. 284 с.
- Abolnik C., Bisschop S., Gerdes T., Olivier A., Horner R.

- Outbreaks of avian influenza H6N2 viruses in chickens arose by a reassortment of H6N8 and H9N2 ostrich viruses // *Virus Genes*. 2007. V. 34. P. 37-45. DOI: 10.1007/s11262-006-0007-6
- Choi Y.K., Seo S.H., Kim J.A., Webby R.J., Webster R.G. Avian influenza viruses in Korean live poultry markets and their pathogenic potential // *Virology*. 2005. V. 332. Iss. 2. P. 529-537. DOI: 10.1016/j.virol.2004.12.002
 - Wang C.W., Wang C.H. Experimental selection of virus derivatives with variations in virulence from a single low-pathogenicity H6N1 avian influenza virus field isolate // *Avian diseases*. 2003. V. 47. Iss. 4. P. 1416-1422. DOI: 10.1637/6093
 - Woolcock P.R., Suarez D.L., Kunej D. Low-pathogenicity avian influenza virus (H6N2) in chickens in California, 2000-2002 // *Avian diseases*. 2003. V. 47. Iss. S3. P. 872-881. DOI: 10.1637/0005-2086-47.s3.872
 - Chin P.S., Hoffmann E., Webby R., Guan Y., Peiris M., Shortridge K.F. Molecular evolution of H6 influenza viruses from poultry in Southeastern China: prevalence of H6N1 influenza viruses possessing seven A/Hong Kong/156/97 (H5N1)-like genes in poultry // *Journal of virology*. 2002. V. 76. Iss. 2. P. 507-516. DOI: 10.1128/jvi.76.2.507-516.2002
 - Munster V.J., Baas C., Lexmond P., Waldenström J., Wallensten A., Fransson T., Rimmelzwaan G.F., Beyer W.E., Schutten M., Olsen B., Osterhaus A., Fouchier R.A. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds // *PLoS Pathog*. 2007. V. 3. Iss. 5. P. e61. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030061
 - Everest H., Hill S.C., Daines R., Sealy J.E., James J., Hansen R., Iqbal M. The Evolution, Spread and Global Threat of H6Nx Avian Influenza Viruses // *Viruses*. 2020. V. 12. N 6. P. 673. DOI: 10.3390/v12060673
 - OIE. World Organization for Animal Health. Avian influenza. URL: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/web-portal-on-avianinfluenza/> (дата обращения: 15.12.2020)
 - The National Training Course on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. 2001. Text. Harbin, China (May 20-26, 2001). Harbin. pp. 25-27.
 - Khan S.U., Gurley E.S., Gerloff N., Rahman M.Z., Simpson N., Rahman M., Haider N., Chowdhury S., Balish A., Zaman R.U., Nasreen S., Chandra Das B., Azziz-Baumgartner E., Sturm-Ramirez K., Davis C.T., Donis R.O., Luby S.P. Avian influenza surveillance in domestic waterfowl and environment of live bird markets in Bangladesh, 2007-2012 // *Scientific reports*. 2018. V. 8. N 1. Article number: 9396. DOI: 10.1038/s41598-018-27515-w

REFERENCES

- Lamb R.A., Krug R.M. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. In: *Fields virology*. Eds.: P.M. Howley, B.M. Fields. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996, pp. 1353-1395.
- Harder T.C., Vahlenkamp T.C. Influenza virus infections in dogs and cats. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2010, vol. 134, iss. 1-2, pp. 54-60. DOI: 10.1016/j.vetimm.2009.10.009
- Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews*. 1992, vol. 56, iss. 1, pp. 152-179.
- Gamblin S.J., Skehel J.J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *Journal of*

biological chemistry, 2010, vol. 285, iss. 37, pp. 28403-28409. DOI: 10.1074/jbc.R110.129809

5. Tong S., Li Y., Rivaller P., Conrardy C., Castillo D.A., Chen L.M., Recuenco S., Ellison J.A., Davis C.T., York I.A., Turmelle A.S., Moran D., Rogers S., Shi M., Tao Y., Weil M.R., Tang K., Rowe L.A., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K.A., Cox N.J., Anderson L.J., Rupprecht C.E., Donis R.O. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, vol. 109, no. 11, pp. 4269-4274. DOI: 10.1073/pnas.1116200109

6. Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L.M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., 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, vol. 9, no. 10, e1003657. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003657

7. Campitelli L., Ciccozzi M., Salemi M. H5N1 influenza virus evolution: a comparison of different epidemics in birds and humans (1997-2004). *Journal of General Virology*, 2006, vol. 87, iss. 4, pp. 955-960. DOI: 10.1099/vir.0.81397-0

8. Smith G.J.D., Naipospos T.S.P., Nguyen T.D., Vijaykrishna D., Usman T.B., Hassan S.S., Nguyen T.V., Dao T.V., Bui N.A. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology*, 2006, vol. 350, iss. 2, pp. 258-268. DOI: 10.1016/j.virol.2006.03.048

9. Yurlov K.T. *Migratsii ptits v Azii* [Migrations of birds in Asia]. Novosibirsk, Nauka Publ., 1977, 284 p. (In Russian)

10. Abolnik C., Bisschop S., Gerdes T., Olivier A., Horner R. Outbreaks of avian influenza H6N2 viruses in chickens arose by a reassortment of H6N8 and H9N2 ostrich viruses. *Virus Genes*, 2007, vol. 34, pp. 37-45. DOI: 10.1007/s11262-006-0007-6

11. Choi Y.K., Seo S.H., Kim J.A., Webby R.J., Webster R.G. Avian influenza viruses in Korean live poultry markets and their pathogenic potential. *Virology*, 2005, vol. 332, iss. 2, pp. 529-537. DOI: 10.1016/j.virol.2004.12.002

12. Wang C.W., Wang C.H. Experimental selection of virus

derivatives with variations in virulence from a single low-pathogenicity H6N1 avian influenza virus field isolate.

Avian diseases, 2003, vol. 47, iss. 4, pp. 1416-1422. DOI: 10.1637/6093

13. Woolcock P.R., Suarez D.L., Kunev D. Low-pathogenicity avian influenza virus (H6N2) in chickens in California, 2000-2002. *Avian diseases*, 2003, vol. 47, iss. S3, pp. 872-881. DOI: 10.1637/0005-2086-47.s3.872

14. Chin P.S., Hoffmann E., Webby R., Guan Y., Peiris M., Shortridge K.F. Molecular evolution of H6 influenza viruses from poultry in Southeastern China: prevalence of H6N1 influenza viruses possessing seven A/Hong Kong/156/97 (H5N1)-like genes in poultry. *Journal of virology*, 2002, vol. 76, iss. 2, pp. 507-516. DOI: 10.1128/jvi.76.2.507-516.2002

15. Munster V.J., Baas C., Lexmond P., Waldenström J., Wallensten A., Fransson T., Rimmelzwaan G.F., Beyer W.E., Schutten M., Olsen B., Osterhaus A., Fouchier R.A. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLOS Pathogens*, 2007, vol. 3, iss. 5, e61. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030061

16. Everest H., Hill S.C., Daines R., Sealy J.E., James J., Hansen R., Iqbal M. The Evolution, Spread and Global Threat of H6Nx Avian Influenza Viruses. *Viruses*, 2020, vol. 12, no. 6, pp. 673. DOI: 10.3390/v12060673

17. OIE. World Organization for Animal Health. Avian influenza. Available at: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/web-portal-on-avianinfluenza/> (accessed 15.12.2020)

18. The National Training Course on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Harbin, 20-26 May 2001. Harbin, 2001, pp. 25-27.

19. Khan S.U., Gurley E.S., Gerloff N., Rahman M.Z., Simpson N., Rahman M., Haider N., Chowdhury S., Balish A., Zaman R.U., Nasreen S., Chandra Das B., Azziz-Baumgartner E., Sturm-Ramirez K., Davis C.T., Donis R.O., Luby S.P. Avian influenza surveillance in domestic waterfowl and environment of live bird markets in Bangladesh, 2007-2012. *Scientific reports*, 2018, vol. 8, no. 1, article number: 9396 9396. DOI: 10.1038/s41598-018-27515-w

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Кирилл А. Шаршов, Синьсинь Ли, Алексей В. Друзяка и Марьям М. Меджидова собирали биологический материал. Синьсинь Ли, Никита А. Дубовицкий и Эльмира М. Мусинова проводили наработку изолятов вируса, субтипирование и анализ. Синьсинь Ли, Никита А. Дубовицкий, Анастасия А. Дерко и Александр В. Глушченко вели вирусологические работы по выявлению изолятов, проводили постановку тестов реакции гемагглютинации и реакции торможения гемагглютинации. Иван А. Соболев проводил моделирование пространственных структур HA и NA и анализ данных сиквенса. Александр М. Шестопалов планировал исследование, подготавливал рукопись для подачи в редакцию. Все авторы в равной степени несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата и других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Kirill A. Sharshov, Xinxin Li, Aleksey V. Druzyaka and Maryam M. Medzhidova collected biological material. Xinxin Li, Nikita A. Dubovitskiy and Elmira M. Musinova conducted the cultivation of isolates, subtyping and analysis. Xinxin Li, Nikita A. Dubovitskiy, Anastasiya A. Derko and Alexandra V. Glushchenko carried out work to detect viral isolates using hemagglutination assay and hemagglutination inhibition test. Ivan A. Sobolev accomplished modeling of HA and NA structure and whole-genome sequencing. Alexander M. Shestopalov corrected the manuscript prior to submission to the editor. All authors are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism or other ethical transgressions.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Синьсинь Ли / Xinxin Li <https://orcid.org/0000-0003-1855-8646>

Никита А. Дубовицкий / Nikita A. Dubovitskiy <https://orcid.org/0000-0002-7780-1485>

Анастасия А. Дерко / Anastasiya A. Derko <https://orcid.org/0000-0002-5984-0819>

Александра В. Глущенко / Alexandra V. Glushchenko <https://orcid.org/0000-0002-5784-0073>

Иван А. Соболев / Ivan A. Sobolev <https://orcid.org/0000-0002-4561-6517>

Алексей В. Друзяка / Aleksey V. Druzyaka <https://orcid.org/0000-0002-3597-1283>

Марьям М. Меджидова / Maryam M. Medzhidova <https://orcid.org/0000-0002-7353-0497>

Эльмира М. Муסיнова / Elmira M. Musinova <https://orcid.org/0000-0001-8241-9013>

Кирилл А. Шаршов / Kirill A. Sharshov <https://orcid.org/0000-0002-3946-9872>

Александр М. Шестопалов / Alexander M. Shestopalov <https://orcid.org/0000-0002-9734-0620>