

Сравнительный анализ методов экстракции вируса гриппа птиц из сырого коровьего молока

✉ Глазунова А.А.¹, Севских Т.А.¹, Кудряшов Д.А.¹, Лунина Д.А.², Титов И.А.¹

¹Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии
Владимирская область, п. Вольгинский, Россия

²Самарский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал ФИЦВиМ
Самара, Россия

✉ e-mail: GlazunovaAA@inbox.ru

В статье представлены данные эпизоотической ситуации по гриппу птиц (ГП) в России и в мире для общей оценки рисков возникновения вспышек ГП у КРС на территории России, а также результаты проверки эффективности методов выделения РНК-вируса из молока для молекулярной диагностики. Отмечена тенденция глобального роста числа вспышек ГП не только среди птиц, но и млекопитающих, включая человека. Особую обеспокоенность у научного сообщества вызвала вспышка высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВППГ) подтипа H5N1 среди КРС в США, зарегистрированная в феврале 2024 г. С начала нотификации общее число инфицированных животных превысило 80 гол. В данной ситуации потенциальную угрозу для здоровья людей создает наличие вируса в высоких концентрациях в коровьем молоке. Исследование проведено в 2024 г. Для описания эпизоотической картины вируса ГП использованы данные о вспышках ВППГ из Всемирной системы информации о здоровье животных. Проведены лабораторные исследования с использованием коммерческих наборов, предназначенных для экстракции РНК из биологического материала на основе сорбции нуклеиновых кислот на поверхности силикагеля и магнитной сепарации, доступных на российском рынке. Эффективность выделения РНК оценивали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. Данные эпизоотической ситуации по ГП свидетельствуют о необходимости тщательного мониторинга распространения вируса среди птиц и млекопитающих. Несмотря на низкий риск выявления гриппа А среди КРС в России, необходимо поддерживать высокий уровень готовности к проведению диагностических исследований. Для исследования молока на ГП оптимальный результат показал коммерческий набор для выделения РНК на основе магнитной сорбции с последующей обратной транскрипцией коммерческим набором «РЕВЕРТА-L» и ПЦР в режиме реального времени по протоколу FLI, Германия (Институт Фридриха Лёффлера).

Ключевые слова: грипп птиц, крупный рогатый скот, молоко, выделение нуклеиновых кислот, экспериментальная работа

Comparative analysis of the extraction methods of avian influenza virus from raw cow's milk

✉ Glazunova A.A.¹, Sevskikh T.A.¹, Kudryashov D.A.¹, Lunina D.A.², Titov I.A.¹

¹Federal Research Center for Virology and Microbiology
Volginsky settlement, Vladimir region, Russia

²Samara Veterinary Research Institute – Branch of the Federal Research Center for Virology and Microbiology
Samara, Russia

✉ e-mail: GlazunovaAA@inbox.ru

The article presents data on the epizootic situation of avian influenza (AI) in Russia and in the world for the general assessment of the risks of outbreaks of AI in cattle in Russia, as well as the results of testing the effectiveness of the methods of virus RNA isolation from milk for molecular diagnostics. There has been a trend of a global increase in the number of AI outbreaks not only in birds but also in mammals, including humans. Of particular concern to the scientific community is the outbreak of highly pathogenic avian influenza virus (HPAI) subtype H5N1 in cattle in the United States reported in February 2024. Since notification began, the total number of infected animals has exceeded

80 animals. In this situation, the potential threat to human health is posed by the presence of the virus in high concentrations in cow's milk. The study was conducted in 2024. Data on the AI outbreaks from the World Animal Health Information System were used to describe the epizootic pattern of the HPAI virus. Laboratory studies have been conducted using commercial kits designed for RNA extraction from biological material based on nucleic acid sorption on silica gel surface and magnetic separation available on the Russian market. The efficiency of RNA isolation was evaluated by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method. The data of the epizootic situation on AI indicate the need for careful monitoring of the virus spread among birds and mammals. Despite the low risk of Influenza A detection among cattle in Russia, it is necessary to maintain a high level of preparedness for diagnostic tests. A commercial kit for RNA isolation based on magnetic sorption followed by reverse transcription with a commercial kit "REVERTA-L" and RT-PCR according to FLI protocol, Germany (Friedrich Loeffler Institute) showed optimal results for milk testing for AI.

Keywords: avian influenza, cattle, milk, nucleic acid release, experimental work

Для цитирования: Глазунова А.А., Севских Т.А., Кудряшов Д.А., Лунина Д.А., Титов И.А. Сравнительный анализ методов экстракции вируса гриппа птиц из сырого коровьего молока // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2024. Т. 54. № 11. С. 116–125. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2024-11-12>

For citation: Glazunova A.A., Sevskikh T.A., Kudryashov D.A., Lunina D.A., Titov I.A. Comparative analysis of the extraction methods of avian influenza virus from raw cow's milk. *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki = Siberian Herald of Agricultural Science*, 2024, vol. 54, no. 11, pp. 116–125. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2024-11-12>

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В 2020-е годы во всем мире наблюдается рост числа вспышек гриппа птиц (ГП), затрагивающих не только диких и домашних птиц, но и млекопитающих, включая человека¹ [1].

Несмотря на предпринимаемые меры биобезопасности, вспышки гриппа птиц представляют серьезную угрозу для птицеводческих предприятий [2], в последнее время – и для молочных ферм, что связано с участвовавшими случаями выявления высокопатогенного гриппа А и его способностью к антигенному дрейфу и шифту, ведущим к повышению вирулентности, патогенности и преодолению межвидового барьера [3].

В феврале 2024 г. в СМИ появилась информация о выявлении вируса ГП у крупного рогатого скота в США [4]. Вспышка высоко-

патогенного вируса гриппа птиц (ВППП) под-
типа H5N1 была зарегистрирована у живот-
ных в штатах Техас, Канзас и Нью-Мексико².
Предполагается, что источником инфекции
послужили дикие птицы [5]³. В настоящее
время заражение подтверждено более чем у
80 гол. крупного рогатого скота в 11 штатах
США⁴.

Особую обеспокоенность научного со-
общества вызывает высокая концентрация
вируса (высокие титры) в коровьем молоке
от зараженных особей. Это открытие пред-
ставляет потенциальную угрозу для здоровья
населения, в первую очередь для работников
фермерских хозяйств, контактирующих с ин-
фицированными животными и продуктами
их жизнедеятельности. Возникает вопрос о
потенциальной возможности передачи H5N1

¹Avian Influenza // World Organisation for Animal Health . URL: <https://www.woah.org/en/disease/avian-influenza/> (дата обращения: 20.06.2024).

²Bird Flu Spreads to Dairy Cows // The New York Time . URL: <https://www.nytimes.com/2024/03/25/science/bird-flu-cows-milk.html> (дата обращения: 20.06.2024).

³A person in Texas caught bird flu after exposure to cows that were thought to be ill // NPR . URL: <https://www.npr.org/2024/03/31/1241897770/bird-flu-dairy-cows-idaho-kansas-texas-michigan-new-mexico> (дата обращения: 18.06.2024)

⁴Cattle in eleven US states with outbreaks of avian flu H5N1 // MercoPress . URL: <https://en.mercopress.com/2024/06/10/cattle-in-eleven-us-states-with-outbreaks-of-avian-flu-h5n1> (дата обращения: 18.06.2024).

человеку через потребление зараженных молочных продуктов [6]⁵. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) подтвердило наличие фрагментов генетического материала ВППП в некоторых образцах пастеризованного молока⁶.

Несмотря на то, что на данный момент риск инфицирования людей оценивается как низкий, выявление фрагментов РНК вируса в пастеризованной продукции вызывает серьезные опасения⁷.

Имеются сообщения о заражении человека вирусом гриппа А (H5N1). Национальный координационный центр по гриппу Соединенных Штатов Америки (NFP) 1 апреля 2024 г. проинформировал Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ) о лабораторно подтвержденном случае заражения человека вирусом гриппа А (H5N1). У пациента, имевшего в анамнезе контакт с инфицированным вирусом крупным рогатым скотом, симптомы заболевания развились 27 марта. На данный момент этот случай заражения человека вирусом А (H5N1) является единичным. Учитывая отсутствие мутаций вируса, способствующих передаче от человека человеку, ВОЗ оценивает риск для населения как низкий. В то же время, для лиц, контактирующих с больными животными в профессиональной деятельности, риск заражения оценивается как низкий и умеренный⁷.

Важно отметить, что вспышки ВППП среди млекопитающих, в том числе и среди крупного рогатого скота, создают благоприятные условия для мутации вируса [7]⁸. В сложившейся

ситуации крайне важно усилить мониторинг циркуляции ВППП как среди диких и домашних птиц, так и среди сельскохозяйственных животных. Своевременная и эффективная диагностика играет ключевую роль в сдерживании распространения инфекции [8]⁹.

Цель исследования – верификация российских коммерческих наборов для выделения нуклеиновых кислот на возможность проведения экстракции РНК-вируса гриппа А из цельного коровьего молока для дальнейшей диагностики ВГПА методом ПЦР в режиме реального времени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Данное исследование проводилось на базе Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии (ФИЦВиМ) в 2024 г. Для отображения эпизоотической ситуации по ВГП использовались данные Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ) за 2023, 2024 гг. С помощью программы ArcGIS 10.6.1 были построены карты, визуализирующие распространение вируса ГП в мире и на территории Российской Федерации.

Все экспериментальные работы осуществляли в соответствии с СанПиН 3.3686-21¹⁰. Исследования проводили в двух отдельных помещениях (зонах) согласно МУ 1.3.2569-09¹¹.

В экспериментальной части исследования использовали свежее цельное коровье молоко от частного производителя, прошедшее только первичную обработку (фильтрацию и охлаждение). Для моделирования заражения использовали инактивированный препарат

⁵H5N1 Bird Flu Isn't a Human Pandemic—Yet. American Contrariness Could Turn It into One // Scientific American. URL: <https://www.scientificamerican.com/article/h5n1-bird-flu-isnt-a-human-pandemic-yet/> (дата обращения: 10.06.2024).

⁶Avian influenza virus type A (H5N1) in U.S. dairy cattle. AVMA: June 11, 2024 // FluTrackers.com . URL: <https://flutrackers.com/forum/forum/united-states/h5n1-tracking-af/991913-avian-influenza-virus-type-a-h5n1-in-u-s-dairy-cattle-avma-june-11-2024> (дата обращения: 20.06.2024).

⁷Avian Influenza A(H5N1) - United States of America // World Health Organisation . URL: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON512> (дата обращения: 17.06.2024).

⁸H5N1 influenza outbreak in Texas dairy cattle sparks multi-species transmission concerns // NEWS MEDICAL . URL: <https://www.news-medical.net/news/20240611/H5N1-influenza-outbreak-in-Texas-dairy-cattle-sparks-multi-species-transmission-concerns.aspx> (дата обращения: 20.06.2024).

⁹The ongoing avian influenza outbreak in the United States // The Poultry Site . URL: <https://www.thepoultrysite.com/news/2024/05/the-ongoing-avian-influenza-outbreak-in-the-united-states> (дата обращения: 17.06.2024).

¹⁰Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. URL: <https://docs.cntd.ru/document/573660140/> (дата обращения: 18.06.2024).

¹¹Методические указания (МУ 1.3.2569-09) // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов . URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200077791> (дата обращения: 18.06.2024).

аллантаической жидкости куриных эмбрионов, содержащий РНК вируса гриппа птиц подтипа H2N3. Контаминацию проводили путем смешивания РНК-содержащего материала с молоком в различных соотношениях. Аналогичное смешивание проводили с водой в качестве контрольной группы (см. табл. 1).

Для валидации использовали часто применяемые в ветеринарной лабораторной практике и доступные на российском рынке коммерческие наборы для выделения нуклеиновых кислот на основе магнитной сепарации и нуклеосорбции на силикагеле. Выделение РНК из полученных образцов проводили в соответствии с инструкциями производителей выбранных коммерческих наборов.

Обратную транскрипцию выделенной РНК осуществляли с использованием коммерческого набора «РЕВЕРТА-L» в соответствии с рекомендациями производителя. Полимеразную цепную реакцию с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили согласно верифицированным протоколам, рекомендованным Институтом Фридриха Лёффлера (FLI, Германия) [9]. В соответствии с данным протоколом использовали праймеры и зонд, готовую реакционную смесь для ПЦР (5X qPCRmix-NS) и деионизированную воду, не содержащую нуклеаз. Амплификацию проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) с детекцией сигнала в канале FAM, используя температурно-временной режим, представленный в табл. 2.

Табл. 1. Соотношения объема вирусного материала и молока/воды при моделировании заражения

Table 1. Viral material and milk/water volume ratios in infection modeling

Номер образца	Объем РНК-содержащего материала (мкл)	Объем молока (мкл)
1	25	75
2	10	90
3	5	95
Номер образца	Объем РНК-содержащего материала (мкл)	Объем воды (мкл)
4	25	75
5	10	90
6	5	95

Табл. 2. Температурно-временной режим амплификации

Table 2. Temperature-time profile for amplification

Температурно-временной режим амплификации	Число циклов
95 °C – 1 мин	1
95 °C – 15 с	45
56 °C – 20 с, детекция FAM	
72 °C – 30 с	

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эпизоотическая ситуация по гриппу птиц в мире за последнее время значительно изменилась в сторону сохранения устойчивого неблагополучия среди дикой орнитофауны и увеличения генетического разнообразия циркулирующих штаммов вируса, создавая угрозу риска заноса вируса в птицеводческие предприятия [10–12].

Следует отметить, что за 2023 г., согласно информации, представленной через Всемирную систему информации о здоровье животных (WANIS) ВОЗЖ, было выявлено более 5500 случаев заболевания среди домашних и диких птиц, а также включая некоторые виды млекопитающих (см. рис. 1). С 2023 г. ВПП затронул 10 новых стран и территорий в Латинской Америке и Антарктическом регионе: Боливия, Коста-Рика и Гватемала (январь 2023 г.); Аргентина, Куба и Уругвай (февраль 2023 г.); Бразилия и Парагвай (май 2023 г.); Фолклендские острова, Южная Георгия и Южные Сандвичевы острова (октябрь 2023 г.); две новые страны в Африке: Гамбия (март 2023 г.) и Мозамбик (сентябрь 2023 г.). По последним данным начиная с 2021 г. вирус ГП порастил более чем 25 отрядов птиц и около 40 новых видов млекопитающих.

В период с 1 января по 17 июня 2024 г. зарегистрировано более 890 новых вспышек заболевания ГП (см. рис. 2). Распространение ГП на сегодняшний день достигло небывалого уровня. Зафиксирован случай заражения ГП южнополярного поморника вблизи антарктической исследовательской станции «Примавера» на материковой части Антарктиды.

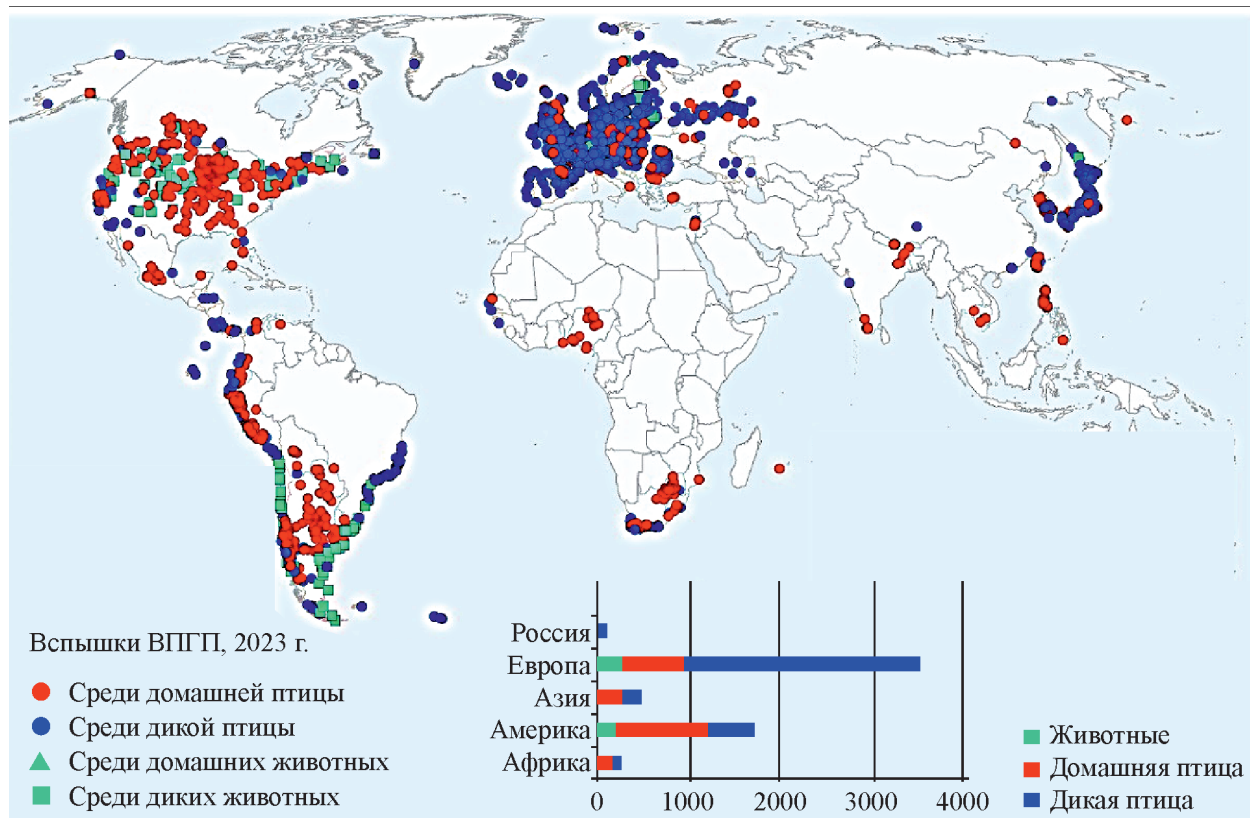


Рис. 1. Вспышки ГП в мире в 2023 г. (ArcGIS Desktop 10.6.1)

Fig. 1. Avian influenza outbreaks worldwide in 2023 (ArcGIS Desktop 10.6.1)

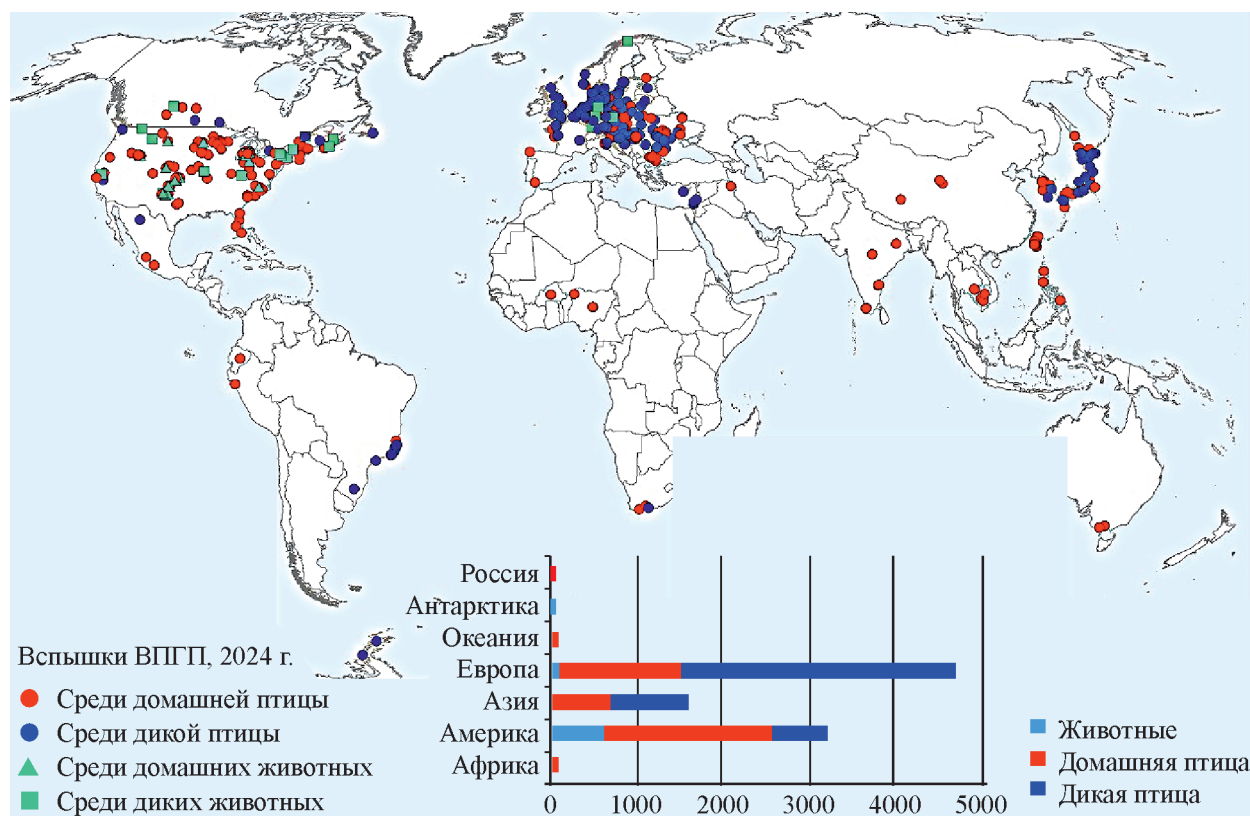


Рис. 2. Вспышки ГП в мире в 2024 г. (ArcGIS Desktop 10.6.1)

Fig. 2. Avian influenza outbreaks worldwide in 2024 (ArcGIS Desktop 10.6.1)

Обнаружение вируса у представителей данного вида вызывает особые опасения, поскольку южнополярные поморники совершают дальние миграции в более северные широты вне гнездового периода, что может способствовать распространению вируса на новые территории.

Для Российской Федерации риск распространения вируса среди дикой и домашней птицы остается критически высоким, в то время как вероятность инфицирования млекопитающих оценивается как низкая (см. рис. 1, 2). Существуют также опубликованные данные о выявлении ГП H3N2 от крупного рогатого скота, перенесшего респираторное заболевание в СССР в 1960-е и 1970-е годы [13]. В связи с этим необходимо обеспечить готовность лабораторий к проведению исследований на наличие РНК вируса гриппа А в образцах молока.

Ранее проводились исследования молока на наличие других РНК-содержащих вирусов. Установлено, что для выделения РНК из сырого молока могут быть использованы различные методы, демонстрирующие разную эффективность. Например, при сравнении трех вариантов пробоподготовки и выделения РНК с помощью набора QIAamp Viral RNA

Mini Kit (Qiagen) было показано, что наилучшие результаты достигаются при использовании стандартного протокола выделения (без модификаций) или при предварительном центрифугировании молока при 4 °C и 6000 g в течение 10 мин [13]. В другом исследовании, сравнивавшем эффективность наборов QIAzol + miRNeasy Mini Kit (Q), TRIzol + RNA Clean and Concentrator Kit (Tri+RCC), TRIzol LS + RCC (TLS+RCC) и экстракцию на основе фенола, и TRIzol LS (TLS), наибольшую эффективность продемонстрировал набор Trizol LS [14].

В настоящее время в Российской Федерации одними из наиболее доступных по цене и качеству являются наборы для выделения РНК с использованием различных нуклеосорбентов, таких, как магнитные частицы и силикагель. [15]. Данные наборы были протестированы на искусственно контаминированных образцах молока и воды. Результаты амплификации представлены на рис. 3, 4.

Анализ полученных данных показал, что использование набора для выделения РНК, основанного на принципе магнитной сепарации, приводит к более ранней детекции целевой последовательности во всех типах образ-

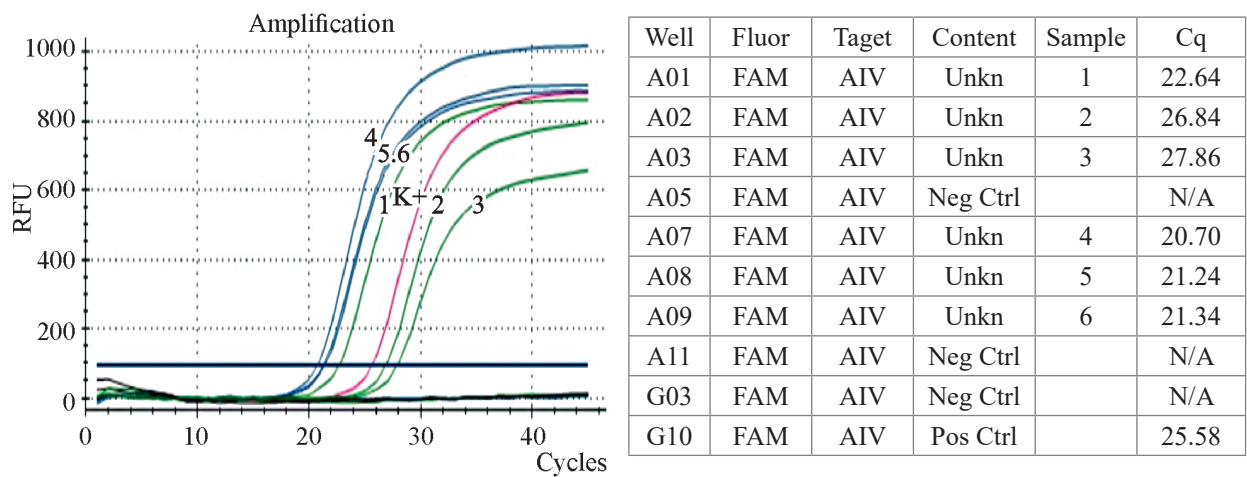


Рис. 3. Результаты амплификации выделенных образцов с использованием коммерческого набора на основе магнитной сепарации.

1 – образец с объемом вируса 25 мкл и молока 75 мкл; 2 – образец с объемом вируса 10 мкл и молока 90 мкл; 3 – образец с объемом вируса 5 мкл и молока 95 мкл; 4 – образец с объемом вируса 25 мкл и воды 75 мкл; 5 – образец с объемом вируса 10 мкл и воды 90 мкл; 6 – образец с объемом вируса 5 мкл и воды 95 мкл; K+ – положительный контроль к-ДНК вируса H2N3

Fig. 3. Results of amplification of the isolated samples using a commercial kit based on magnetic separation. 1 – sample with 25 µL of virus and 75 µL of milk; 2 – sample with 10 µL of virus and 90 µL of milk; 3 – sample with 5 µL of virus and 95 µL of milk; 4 – sample with 25 µL of virus and 75 µL of water; 5 – sample with 10 µL of virus and 90 µL of water; 6 – sample with 5 µL of virus and 95 µL of water; K+ – positive control cDNA of H2N3 virus

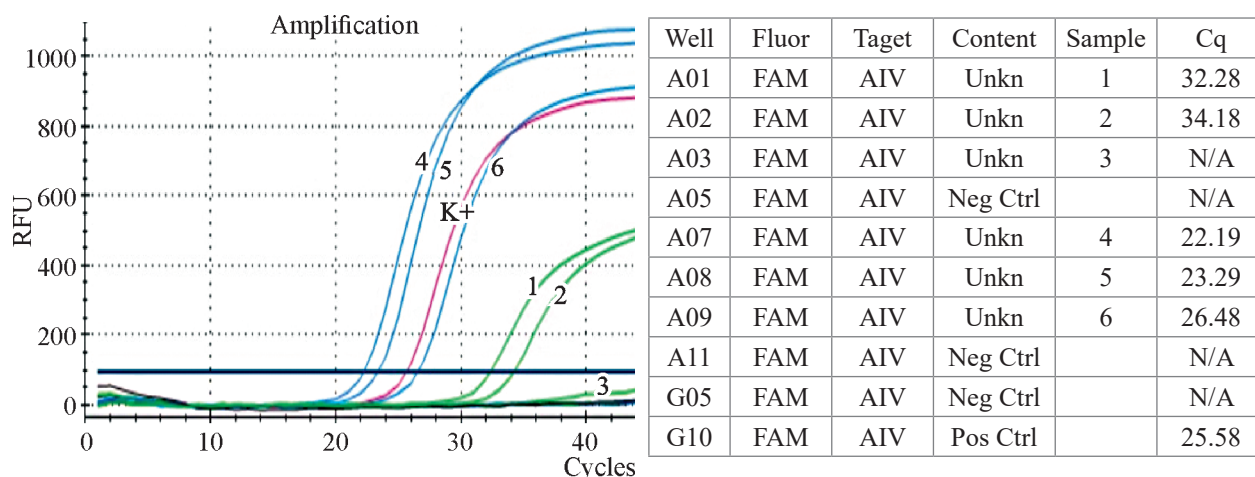


Рис. 4. Результаты амплификации выделенных образцов с использованием коммерческого набора на основе нуклеосорбции на поверхности модифицированного силикагеля.

1 – образец с объемом вируса 25 мкл и молока 75 мкл; 2 – образец с объемом вируса 10 мкл и молока 90 мкл; 3 – образец с объемом вируса 5 мкл и молока 95 мкл; 4 – образец с объемом вируса 25 мкл и воды 75 мкл; 5 – образец с объемом вируса 10 мкл и воды 90 мкл; 6 – образец с объемом вируса 5 мкл и воды 95 мкл; K+ – положительный контроль к-ДНК вируса H2N3

Fig. 4. Results of amplification of the isolated samples using a commercial kit based on nucleosorption on the surface of the modified silica gel.

1 – sample with 25 μ L of virus and 75 μ L of milk; 2 – sample with 10 μ L of virus and 90 μ L of milk; 3 – sample with 5 μ L of virus and 95 μ L of milk; 4 – sample with 25 μ L of virus and 75 μ L of water; 5 – sample with 10 μ L of virus and 90 μ L of water; 6 – sample with 5 μ L of virus and 95 μ L of water; K+ – positive control cDNA of H2N3 virus

цов по сравнению с набором, использующим силикагелевый сорбент. Этот результат может свидетельствовать о более высокой эффективности выделения РНК набором с магнитной сорбцией. Важно отметить, что при использовании набора с модифицированным силикагелем для выделения РНК из образцов молока детекция целевой последовательности была затруднена. Только в двух из трех образцов удалось добиться положительного результата ПЦР. Недостаточная эффективность экстракции РНК набором на основе сорбции нуклеиновых кислот на поверхности силикагеля, особенно в присутствии компонентов молока, возможно связана с наличием в молоке ингибиторов ПЦР, которые не были эффективно удалены в процессе выделения РНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные эпизоотической ситуации по ГП свидетельствуют о необходимости тщательного мониторинга распространения вируса как среди диких и домашних птиц, так и сре-

ди млекопитающих. Несмотря на то что риски выявления гриппа А среди КРС на территориях Российской Федерации оцениваются как низкие, необходимо поддерживать готовность к проведению качественной и быстрой диагностики.

В ходе исследования на предмет экстракции генетического материала возбудителя в образцах молока, высокую эффективность продемонстрировал коммерческий набор для выделения РНК на основе магнитной сепарации с последующей обратной транскрипцией коммерческим набором «РЕВЕРТА-L» и ПЦР в режиме реального времени по протоколу FLI (Германия).

Выбор оптимального метода выделения РНК из молока является важным этапом исследования, при этом необходимо учитывать возможные факторы, влияющие на эффективность выделения, такие как методы пробоподготовки и условия хранения образцов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Szablewski C.M., Iwamoto C., Olsen S.J., Greene C.M., Duca L.M., Davis C.T., Coggeshall K.C., Davis W.W., Emukule G.O., Gould P.L., Fry A.M., Wentworth D.E., Dugan V.G., Kile J.C., Azziz-Baumgartner E. Reported Global Avian Influenza Detections Among Humans and Animals During 2013–2022: Comprehensive Review and Analysis of Available Surveillance Data // *JMIR Public Health Surveill.* 2023. Aug 31. N 9. e46383. DOI: 10.2196/46383.
2. Захарова О.И., Бурова О.А., Торопова Н.Н., Яшин И.В., Блохин А.А. Высокопатогенный грипп птиц в мире: стратегии вакцинации (обзор) // *Аграрная наука Евро-Северо-Востока.* 2022. № 23 (3). С. 295–306. DOI: 10.30766/2072-9081.2022.23.3.295-306.
3. Adlhoch C., Fusaro A., Gonzales J.L., Kuiken T., Mirinavičiūtė G., Niqueux É., Ståhl K., Staubach C., Terregino C., Willgert K., Baldinelli F., Chuzhakina K., Delacourt R., Georganas A., Georgiev M., Kohnle L. Avian influenza overview September-December 2023 // *EFSA Journal.* 2023. Dec 19. N 21(12). e8539. DOI: 10.2903/j.efsa.2023.8539.
4. Burrough E.R., Magstadt D.R., Petersen B., Timmermans S.J., Gauger P.C., Zhang J., Siepker C., Mainenti M., Li G., Thompson A.C., Gorden P.J., Plummer P.J., Main R. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Clade 2.3.4.4b Virus Infection in Domestic Dairy Cattle and Cats, United States, 2024 // *Emerging Infectious Diseases.* 2024. Jul; 30 (7), pp. 1335–1343. DOI: 10.3201/eid3007.240508.
5. Caserta L.C., Frye E.A., Butt S.L., Laverack M., Nooruzzaman M., Covalada L.M., Thompson A.C., Prarat Koscielny M., Cronk B., Johnson A., Kleinhenz K., Edwards E.E., Gomez G., Hitchener G., Martins M., Kapczynski D.R., Suarez D.L., Ruth E., Morris A., Hensley T., Beeby J.S., Lejeune M., Swinford A.K., Elvinger F., Dimitrov K.M., Diel D.G. From birds to mammals: spillover of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus to dairy 2 cattle led to efficient intra- and interspecies transmission // *BioRxiv [Preprint].* 2024. DOI: 10.1101/2024.05.22.595317.
6. Le Sage V., Campbell A.J., Reed D.S., Duprex W.P., Lakdawala S.S. Influenza H5N1 and H1N1 viruses remain infectious in unpasteurized milk on milking machinery surfaces // *MedRxiv [Preprint].* 2024. N 22. DOI: 10.1101/2024.05.22.24307745.
7. Mace J.L., Knight A. Influenza risks arising from mixed intensive pig and poultry farms, with a spotlight on the United Kingdom // *Frontiers in Veterinary Science.* 2023. N 10. DOI: 10.3389/fvets.2023.1310303.
8. Марченко В.Ю., Гончарова Н.И., Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А., Рыжиков А.Б. Обзор эпизоотологической ситуации по высокопатогенному гриппу птиц в России в 2020 г. // *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021. № 2. С. 33–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-33-40.
9. Saucia Sunia Widyantari A.A.A., Kurniawan F.R. Identification of Avian Influenza with the Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Method // *Journal of Pharmaceutical and Health Research.* 2023. N 4 (2), pp. 258–264. DOI: 10.47065/jharma.v4i2.3399.
10. Blagodatski A., Trutneva K., Glazova O., Mityayeva O., Shevkova L., Kegeles E., Onyanov N., Fede K., Maznina A., Khavina E., Yeo S.J., Park H., Volchkov P. Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology // *Pathogens.* 2021. N 10 (5). P. 630. DOI: 10.3390/pathogens10050630.
11. Guo F., Li Y., Yu S., Liu L., Luo T., Pu Z., Xiang D., Shen X., Irwin D.M., Liao M., Shen Y. Adaptive Evolution of Human-Isolated H5Nx Avian Influenza A Viruses // *Frontiers in Microbiology.* 2019. N 10. P. 1328. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01328.
12. Pulit-Penaloza J.A., Brock N., Belser J.A., Sun X., Pappas C., Kieran T.J., Basu Thakur P., Zeng H., Cui D., Frederick J., Fasce R., Tumpey T.M., Maines T.R. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus of clade 2.3.4.4b isolated from a human case in Chile causes fatal disease and transmits between co-housed ferrets // *Emerging Microbes & Infections.* 2024. N 13 (1). P. 2332667. DOI: 10.1080/22221751.2024.2332667.
13. Müller I., Althof N., Hoffmann B., Klaus C., Schilling-Loeffler K., Falkenhagen A., Johne R. Comparison of Extraction Methods for the Detection of Tick-Borne Encephalitis Virus RNA in Goat Raw Milk and Cream Cheese // *Food and Environmental Virology.* 2023. N 15 (1) P. 32–42. DOI: 10.1007/s12560-022-09535-y.
14. Wijenayake S., Eisha S., Tawhidi Z., Pitino M.A., Steele M.A., Fleming A.S., McGowan P.O. Com-

parison of methods for pre-processing, exosome isolation, and RNA extraction in unpasteurized bovine and human milk // *Journal Public Library of Science*. 2021. N 16 (9). P. 0257633. DOI: 10.1371/journal.pone.0257633.

15. Тихвинский М.С., Воробьев А.А., Куби-
рев Я.А., Усенко Г.С., Козлов А.И., Исупов С.Г. Современные подходы к решению задач по подготовке проб к анализу методом полимеразной цепной реакции // *Вестник войск РХБ защиты*. 2021. № 5 (3). С. 236–246. DOI: 10.35825/2587-5728-2021-5-3-236-246.

REFERENCES

1. Szablewski C.M., Iwamoto C., Olsen S.J., Greene C.M., Duca L.M., Davis C.T., Coggeshall K.C., Davis W.W., Emukule G.O., Gould P.L., Fry A.M., Wentworth D.E., Dugan V.G., Kile J.C., Azziz-Baumgartner E. Reported Global Avian Influenza Detections Among Humans and Animals During 2013–2022: Comprehensive Review and Analysis of Available Surveillance Data. *JMIR Public Health Surveill*, 2023. Aug 31, no. 9, e46383. DOI: 10.2196/46383.
2. Zakharova O.I., Burova O.A., Toropova N.N., Yashin I.V., Blokhin A.A. Highly pathogenic avian influenza in the world: vaccination strategies (review). *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka = Agricultural Science Euro-North-East*, 2022, no. 23 (3), pp. 295–306. (In Russian). DOI: 10.30766/2072-9081.2022.23.3.295-306.
3. Adlhoch C., Fusaro A., Gonzales J.L., Kuiken T., Mirinavičiūtė G., Niqueux É., Ståhl K., Staubach C., Terregino C., Willgert K., Baldinelli F., Chuzhakina K., Delacourt R., Georganas A., Georgiev M., Kohnle L. Avian influenza overview September–December 2023. *EFSA Journal*. 2023, Dec 19, no. 21 (12), e8539. DOI: 10.2903/j.efsa.2023.8539.
4. Burrough E.R., Magstadt D.R., Petersen B., Timmermans S.J., Gauger P.C., Zhang J., Siepker C., Mainenti M., Li G., Thompson A.C., Gorden P.J., Plummer P.J., Main R. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Clade 2.3.4.4b Virus Infection in Domestic Dairy Cattle and Cats, United States, 2024. *Emerging Infectious Diseases*, 2024, Jul; 30 (7), pp. 1335–1343. DOI: 10.3201/eid3007.240508.
5. Caserta L.C., Frye E.A., Butt S.L., Lave-rack M., Nooruzzaman M., Covaleda L.M., Thompson A.C., Prarat Koscielny M., Cronk B., Johnson A., Kleinhenz K., Edwards E.E., Gomez G., Hitchener G., Martins M., Kapczynski D.R., Suarez D.L., Ruth E., Morris A., Hensley T., Beeby J.S., Lejeune M., Swinford A.K., Elvinger F., Dimitrov K.M., Diel D.G. From birds to mammals: spillover of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus to dairy 2 cattle led to efficient intra- and interspecies transmission. *BioRxiv [Preprint]*, 2024. DOI: 10.1101/2024.05.22.595317.
6. Le Sage V., Campbell A.J., Reed D.S., Duprex W.P., Lakdawala S.S. Influenza H5N1 and H1N1 viruses remain infectious in unpasteurized milk on milking machinery surfaces. *MedRxiv [Preprint]*. 2024, no. 22. DOI: 10.1101/2024.05.22.24307745.
7. Mace J.L., Knight A. Influenza risks arising from mixed intensive pig and poultry farms, with a spotlight on the United Kingdom. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, no. 10. DOI: 10.3389/fvets.2023.1310303.
8. Marchenko V.Yu., Goncharova N.I., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Ryzhikov A.B. Review of the epizootological situation of highly pathogenic avian influenza in Russia in 2020. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2021, no. 2, pp. 33–40. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-33-40.
9. Sauca Sunia Widyantari A.A.A., Kurniawan F.R. Identification of Avian Influenza with the Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Method. *Journal of Pharmaceutical and Health Research*. 2023, no. 4 (2), pp. 258–264. DOI: 10.47065/jharma.v4i2.3399.
10. Blagodatski A., Trutneva K., Glazova O., Mityaeva O., Shevkova L., Kegeles E., Onyanov N., Fede K., Maznina A., Khavina E., Yeo S.J., Park H., Volchikov P. Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology. *Pathogens*, 2021, no. 10 (5), p. 630. DOI: 10.3390/pathogens10050630.
11. Guo F., Li Y., Yu S., Liu L., Luo T., Pu Z., Xiang D., Shen X., Irwin D.M., Liao M., Shen Y. Adaptive Evolution of Human-Isolated H5Nx Avian Influenza A Viruses. *Frontiers in Microbiology*, 2019, no. 10, p. 1328. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01328.
12. Pulit-Penaloza J.A., Brock N., Belser J.A., Sun X., Pappas C., Kieran T.J., Basu Thakur P., Zeng H., Cui D., Frederick J., Fasce R., Tumpey T.M., Maines T.R. Highly pathoge-

- nic avian influenza A(H5N1) virus of clade 2.3.4.4b isolated from a human case in Chile causes fatal disease and transmits between co-housed ferrets. *Emerging Microbes & Infections*, 2024. no. 13 (1), p. 2332667. DOI: 10.1080/22221751.2024.2332667.
13. Müller I., Althof N., Hoffmann B., Klaus C., Schilling-Loeffler K., Falkenhagen A., Johne R. Comparison of Extraction Methods for the Detection of Tick-Borne Encephalitis Virus RNA in Goat Raw Milk and Cream Cheese. *Food and Environmental Virology*, 2023, no. 15 (1), pp. 32–42. DOI: 10.1007/s12560-022-09535-y.
14. Wijenayake S., Eisha S., Tawhidi Z., Pitiño M.A., Steele M.A., Fleming A.S., McGowan P.O. Comparison of methods for pre-processing, exosome isolation, and RNA extraction in unpasteurized bovine and human milk. *Journal Public Library of Science*, 2021, no. 16 (9), p. 0257633. DOI: 10.1371/journal.pone.0257633.
15. Tikhvinskii M.S., Vorob'ev A.A., Kibirev Ya.A., Usenko G.S., Kozlov A.I., Isupov S.G. Modern approaches to solving problems of sample preparation for analysis by polymerase chain reaction method. *Vestnik voisk RKhB zashchity = Bulletin of the RCB Protection Troops*, 2021, no. 5 (3), pp. 236–246. (In Russian). DOI: 10.35825/2587-5728-2021-5-3-236-246.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

✉ **Глазунова А.А.**, заместитель руководителя группы; **адрес для переписки:** Россия, 601125, Владимирская область, Петушинский район, п. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, строение 1; e-mail: GlazunovaAA@inbox.ru

Севских Т.А., руководитель научно-образовательного центра

Кудряшов Д.А., микробиолог

Лунина Д.А., заместитель руководителя группы

Титов И.А., кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной вирусологии

AUTHOR INFORMATION

✉ **Anastasia A. Glazunova**, Deputy Head of the Group; **address:** Building 1, Akademika Bakulova St., Volginsky Settlement, Petushinsky District, Vladimir Region, 601125, Russia; e-mail: GlazunovaAA@inbox.ru

Timofey A. Sevskikh, Head of the Scientific and Educational Center

Dmitry A. Kudryashov, Microbiologist

Darya A. Lunina, Deputy Head of the Group

Ilya A. Titov, Candidate of Science in Biology, Head of the Molecular Virology Laboratory

Дата поступления статьи / Received by the editors 16.07.2024
Дата принятия к публикации / Accepted for publication 28.08.2024
Дата публикации / Published 13.12.2024