

УДК: 636.5.034:615.371

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.2.46

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И БЕЗВРЕДНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО КАНДИДАТНОГО ШТАММА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ H5N1

Тарлавин Н.В.^{1*} – канд. ветеринар. наук, асс. каф. эпизоотологии им. В.П. Урбана (ORCID 0000-0002-6474-9171); **Веретенников В.В.**¹ – канд. ветеринар. наук, асс. каф. эпизоотологии им. В.П. Урбана (ORCID 0000-0001-9648-2259); **Джавадов Э.Д.**¹ – д-р ветеринар. наук, проф. каф. эпизоотологии им. В.П. Урбана (ORCID 0000-0002-1589-6300); **Сергеева М.В.**² – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории векторных вакцин (ORCID 0000-0003-0411-9896); **Кудря К.С.**² – лаборант-исследователь (ORCID 0000-0003-4774-4294); **Красков Д.А.**¹ – асп. каф. эпизоотологии им. В.П. Урбана (ORCID 0000-0002-2362-2641); **Яковлева А.С.**¹ – студ. 5 курса ФВМ (ORCID 0009-0003-1063-1690); **Горбаков М.Е.**¹ – студ. 4 курса ФВМ (ORCID 0009-0009-6912-2413); **Калиматова А.А.**¹ – студ. 4 курса ФВМ (ORCID 0009-0004-1478-8705); **Хрипункова Д.С.**¹ – студент 4 курса ФВМ (ORCID 0009-0008-3517-3776)

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

² ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»

*tarlav1995@bk.ru

Ключевые слова: высокопатогенный грипп птиц, H5N1, обратная генетика, рекомбинантные вакцины, безвредность вакцин, безопасность вирусов.

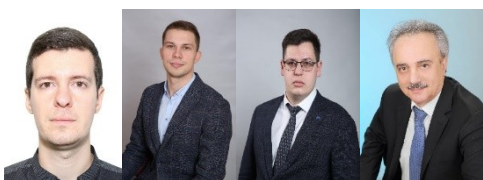
Keywords: highly pathogenic avian influenza, H5N1, reverse genetics, recombinant vaccines, vaccine safety, virus safety.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-76-10044, <https://rscf.ru/project/24-76-10044>

Поступила: 13.03.2025

Принята к публикации: 06.06.2025

Опубликована онлайн: 20.06.2025



РЕФЕРАТ

В рамках работ по гранту РНФ № 24-76-10044 был получен кандидатный вакцинный штамм вируса гриппа птиц A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1), обладающий низковирулентным фенотипом вследствие замены сайта расщепления гемагглютинина. В статье представлены результаты исследований безопасности и безвредности рекомбинантного штамма вируса гриппа птиц A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1). У эмбрионов, инфицированных рекомбинантным вирусом, не наблюдались геморагии и повреждения. Полученные данные свидетельствуют о безопасности вируса A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) для куриных эмбрионов. Изучение безвредности проводили при внутрибрюшинном введении белым мышам неинaktivированного вируса (данная группа также служила контролем для инаktivированных препаратов), и при введении вируса, инаktivированного формали-

ном, бетапропиолактоном и смесью теотропина и мертиолята. Значительной потери веса ни в одной из наблюдаемых групп не было обнаружено, что свидетельствует о безвредности штамма A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 для белых беспородных мышей, а также хорошей переносимости препаратов, полученных с применением всех исследованных схем инактивации. Безвредность инактивированной вакцины, изготовленной на основе изучаемого штамма вируса с добавлением гидроксида алюминия в качестве адъюванта, проверяли путем изучения изменения живой массы суточных цыплят кросса Декалб Уайт. Во всех 3-х исследуемых группах полностью отсутствовали следы истощения, интоксикации, а также следы проявления болезни, что говорит о полной инактивации и безвредности вируса. Оценка безвредности вакцины также была проведена на десяти 150-дневных курах кросса Доминант. После введения 10-кратной прививной дозы в грудную мышцу за птицами наблюдали в течение 28 сут.. Все куры в течение указанного времени остались живыми, без видимых клинических признаков переболевания и в месте введения вакцины отсутствовали следы воспалительной реакции. Можно сделать вывод, что штамм A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) безопасен, а инактивированные вакцины, изготовленные из данного штамма, полностью безвредны..

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Вирусы гриппа птиц вызывают серьезную опасность и требуют постоянного наблюдения со стороны мирового общественного здравоохранения [2]. Высокопатогенный вирус гриппа птиц типа А подтипа H5N1 вызывает серьезные вспышки заболевания и является причиной массовой гибели домашней птицы, что приводит к огромным экономическим потерям в промышленном птицеводстве [6]. Традиционно возбудителями высокопатогенного гриппа птиц считаются вирусы гриппа типа А подтипов H5N1 и H7N9 [5, 9]. Однако высоковирулентный фенотип вируса определяется не подтипом вируса, а сайтом расщепления гемагглютинаина, который даже в вирусах гриппа подтипа H5N1 и H7N9 может соответствовать низковирулентным профилям [4]. Оценивается вирулентность изолята вируса гриппа при помощи измерения индекса внутривенной патогенности (IVPI), а также путем оценки патоморфологических изменений в зараженном развивающемся курином эмбрионе при проведении вирусологического исследования.

В природе встречаются естественно-аттенуированные низковирулентные штаммы вируса гриппа подтипа H5N1. Однако наиболее надежный и быстрый способ получить вакцинный кандидат предоставляют методы геномного редак-

тирования микроорганизмов с последующей сборкой вакцинного штамма методами обратной генетики [8]. Данная работа была проведена в рамках гранта Российского научного фонда № 24-76-10044 по разработке российских рекомбинантных вакцин против высоко- и низкопатогенного гриппа птиц для ветеринарного применения.

Наиболее эффективным способом профилактики эпидемий и панзоотий гриппа в большинстве стран считается вакцинация [7]. Для профилактики высокопатогенного гриппа широко распространено применение инактивированных вакцин, доклинические испытания которых обязательно включают в себя оценку безвредности вакцины [1]. Также безопасность применяемых вакцинных вирусов оценивается на лабораторных животных, восприимчивых к вирусам гриппа птиц (лабораторные мыши, хорьки, морские свинки и прочие).

Целью данной работы является оценка безопасности низковирулентного высокопродуктивного вакцинного штамма A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1), сконструированного с помощью метода обратной генетики, предназначенного для создания ветеринарной вакцины для домашней птицы, а также оценка безвредности кандидатной вакцины, созданной на основе данного штамма согласно требованиям ГОСТ 31926-2013 к препаратам для вете-

ринарного применения. Штамм A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) задепонирован в Государственной Коллекции Вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ» им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Место выделения – Лаборатория векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России в рамках выполнения проекта РНФ 24-76-10044.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Для оценки безопасности рекомбинантного вируса использовали 10-дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ), которые исследовали на наличие поражений через 36 ч после заражения. После окончания инкубации проверяли жизнеспособность эмбрионов визуально с использованием овоскопа, после чего эмбрионы охлаждали при 4°C в течение 5 часов и вскрывали. Аллантоис проверяли на гемагглютинирующую активность вируса, эмбрионы извлекали и осматривали на предмет повреждений.

Материал для инаktivации получали накоплением вируса в системе РКЭ. Титр вируса до инаktivации составлял 9,4 lg ЭИД₅₀/1 мл. Вирус без инаktivации хранили при температуре 4°C в течение 3 дней. Для последующего проведения опыта по оценке безопасности кандидатного штамма вирус был инаktivирован 3-мя различными способами (формалин, бетапропиолактон, смесь теотропина и мертиолята). Формалин (ООО «Октан») добавляли к вирусу до конечной концентрации 0,04% (по формальдегиду), инкубировали при температуре 37°C в течение 16 часов, после чего инаktivированный вирус хранили при температуре 4°C. Бетапропиолактон (SERVA) добавляли к вирусу до конечной концентрации 0,1%, инкубировали в течение 16 часов при температуре 4°C, после чего в течение 2 часов при температуре 37°C для полной инаktivации остатков бетапропиолактона. Для инаktivации смесью теотропина (ООО «БИОФАРМ») и мертиолята (Диаэм) сперва к вирусу добавляли теотропин до конечной концентрации

0,6%, инкубировали вирус в течение 24 часов при температуре 37°C, после чего к вирусу с теотропином добавляли мертиолят (с целью стабилизации и антимикотической обработки инаktivированного вируса) до конечной концентрации 0,01%, инкубировали в течение 24 часов при температуре 37°C. Инаktivированные вирусы хранили при температуре 4°C в течение 3 дней. После проведения инаktivации вируса вышеперечисленными способами проводили оценку полноты инаktivации путем проведения 3-кратных последовательных пассажей на 10-дневных РКЭ. Аллантоис эмбрионов проверяли на гемагглютинирующую активность вируса, во всех трех пассажах данная активность отсутствовала.

В эксперименте использовали белых беспородных мышей самцов. Каждая группа содержала по 6 мышей согласно МУ 3.3.2.1758-03. Мышей в каждой группе маркировали биологическими красками. В зависимости от группы мышам вводили 0.5 мл внутривенно препарат (вирус без инаktivации, формалин-инаktivированный вирус, вирус, инаktivированный бетапропиолактоном или вирус, инаktivированный смесью теотропина и мертиолята [3]). Группа интактных животных служила для контроля фоновых параметров иммунного ответа и контроля веса/выживаемости для определения безвредности. Мышей иммунизировали дважды с интервалом 21 день. Контролем изменения массы тела служила группа интактных животных. На протяжении 7 дней после каждой иммунизации мониторили изменение массы тела мышей.

Для оценки безвредности биопрепаратов на основе штамма A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) у суточных цыплят подготовили кандидатную вакцину путем инаktivации вируса формальдегидом с добавлением в качестве адьюванта гидроксида алюминия до конечной концентрации 0,2%.

Из клинически здоровых цыплят сформировали 3 группы, по 10 голов в каждой, по следующей схеме:

группа № 1 — суточные цыплята кросса «Декалб Уайт», вакцинированные в дозе 8,0 lg ЭИД50 на 1 гол. подкожно в объеме 0,5 мл;

группа № 2 — суточные цыплята кросса «Декалб Уайт», вакцинированные в дозе 8,0 lg ЭИД50 на 1 гол. подкожно в объеме 0,5 мл, ревакцинированные в аналогичной дозе в 14 сутки;

группа № 3 — контрольная, интактные суточные цыплята кросса «Декалб Уайт».

Безвредность данной вакцины у взрослых птиц проверяли на десяти 150-дневных курах породы Доминант введением 10-кратной прививной дозы внутримышечно в грудную мышцу в соответствии с ГОСТ 31926-2013 «СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ. Методы определения безвредности». Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам, принятым Европейской конвенцией ETS № 123.

РЕЗУЛЬТАТЫ/ RESULTS

У эмбрионов, инфицированных живым вирусом A/Syktvkar/PR8/6:2/HA20, не наблюдались геморагии и повреждения. Все эмбрионы были живыми на момент снятия с инкубации (36 часов инкубации). Визуально инфицированные эмбрионы не имели значительных отличий от контрольных. Полученные данные свидетельствуют о безопасности вируса A/Syktvkar/PR8/6:2/HA20 для РКЭ. Данная картина сложилась вследствие произведенной замены в сайте расщепления гемагглютинаина на этапе сборки вируса методами обратной генетики, из-за чего вирус A/Syktvkar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) приобрел низкопатогенный профиль и потерял способность вызывать патоморфологические изменения у эмбрионов.

Изучение безвредности проводили при внутрибрюшинном введении белым мышам неинaktivированного вируса, и при введении вируса, инаktivированного формалином, бетапропиолактоном и смесью теотропина и мертиолята. Для контроля общего состояния ещё одну группу животных составляли интактные мыши.

В течение 7 дней после каждой иммунизации проводили мониторинг изменения массы тела мышей (рис 2). На графике представлены средние значения по каждой группе для изменения веса в обозначенный день относительно для иммунизации в процентах. Значительной потери веса ни в одной из наблюдаемых групп не было обнаружено, что свидетельствует о безвредности штамма A/Syktvkar/PR8/6:2/HA20 для белых беспородных мышей, а также хорошей переносимости препаратов, полученных с применением всех исследованных схем инаktivации. Также ни в одной исследуемой группе не было отмечено ни гибели мышей, ни прочих проявлений клинических проявлений гриппа, включая группу, которой ввели не инаktivированный вирус. Данный результат подтверждает полученные ранее данные о низкопатогенном профиле созданного вакцинного рекомбинантного штамма.

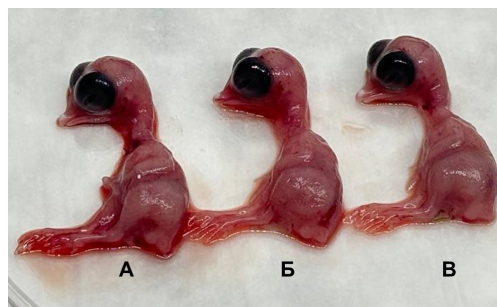


Рисунок 1 – Фотография извлеченных эмбрионов. А, Б – эмбрионы, инфицированные вирусом A/Syktvkar/PR8/6:2/HA20. В – контрольный эмбрион.

Также безвредность инаktivированной вакцины, изготовленной на основе вируса A/Syktvkar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) с добавлением гидроксида алюминия в качестве адьюванта, проверяли путем изучения изменения живой массы суточных цыплят кросса Декалб Уайт (рисунок 3). К 28-му дню наблюдений живая масса цыплят колебалась от 205 г в группе, иммунизированной дважды, до 237 г в контрольной группе. Разница между средней живой массой в контрольной группе и

группе №1 (вакцинированной однократно), составила 11,5 г. Во всех трех исследуемых группах полностью отсутствовали следы истощения, интоксикации, а также следы проявления болезни, что говорит о полной инаktivации вируса и безвредности вакцинного препарата на его основе.

Согласно ГОСТ 31926-2013 “СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ. Ме-

тоды определения безвредности” была проведена оценка безвредности вакцины на десяти 150-дневных курах кросса Доминант. После введения 10-кратной прививной дозы в грудную мышцу за птицами наблюдали в течение 28 суток. Все куры в течение указанного времени остались живыми, без видимых клинических признаков заболевания, и в месте введения вакцины отсутствовали следы воспалительной реакции.

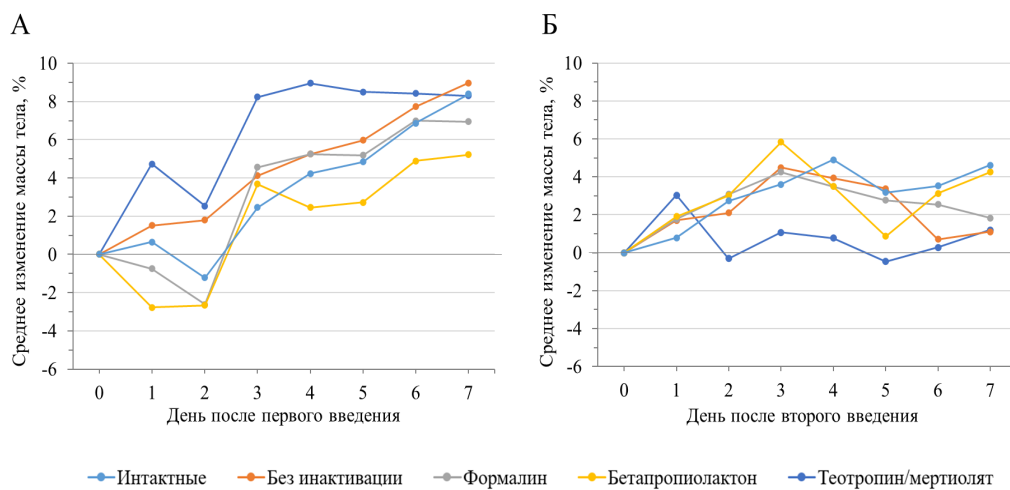


Рисунок 2 – Изменение массы тела мышей в процентах от исходной. (А) после первого введения вируса, (Б) после второго введения вируса.

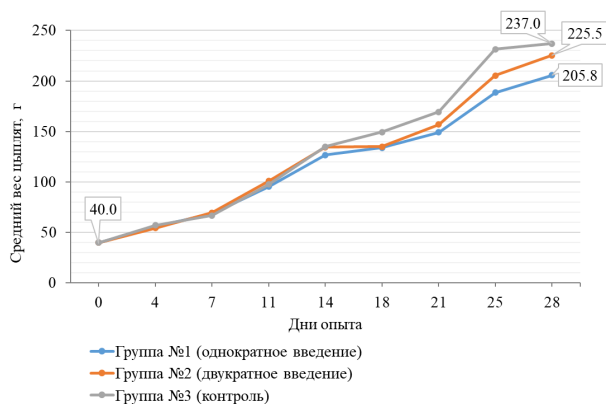


Рисунок 3 – Изменение массы тела цыплят после иммунизации.

ВЫВОДЫ/ CONCLUSION

Созданный в рамках работ по гранту Российского научного фонда № 24-76-10044 рекомбинантный вакцинный штамм A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) обладает низковирулентным фенотипом, а вакцины, изготовленные на его основе, полностью безвредны. Данные результаты были получены путем оценки патоморфологических изменений зараженных куриных эмбрионов в сравнении с контролем, а также путем введения вакцин на основе данного вируса лабораторным (мыши) и целевым (суточные цыплята) животным. В течение всего периода наблюдения, иммунизированные лабораторные и целевые животные не проявили признаков истощения, интоксикации и задержки в развитии, а их живая масса набиралась в пределах физиологической нормы. Гидроксид алюминия, примененный в качестве адъюванта, также не вызвал у подопытных цыплят воспалительной реакции, и, следовательно, подходит для создания вакцины. Таким образом можно сделать вывод, что штамм A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) безопасен, а инаktivированные вакцины, изготовленные из данного штамма, полностью безвредны.

ASSESSMENT OF THE SAFETY AND HARMLESSNESS OF A RECOMBINANT VACCINE STRAIN FOR THE PREVENTION OF HIGHLY PATHOGENIC H5N1 AVIAN INFLUENZA

Tarlavin N.V.^{1*} – Candidate of veterinary sciences, Senior lecturer of the Department of Epizootology named after V.P. Urban (ORCID 0000-0002-6474-9171), **Veretennikov V.V.**¹ – Senior lecturer of the Department of Epizootology named after V.P. Urban (ORCID 0000-0001-9648-2259), **Javadov E.J.**¹ – Doctor of Historical Sciences, Professor of the Department of Epizootology named after V.P. Urbana (ORCID 0000-0002-1589-6300), **Sergeeva M.V.**² – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of Vector Vaccines (ORCID 0000-0003-0411-9896), **Kudrya K.S.**² – Laboratory researcher (ORCID 0000-0003-4774-4294), **Kraskov**

D.A.¹ – postgraduate student of the Department of Epizootology named after V.P. Urban (ORCID 0000-0002-2362-2641), **Yakovleva A.S.**¹ – 5th year student (ORCID 0009-0003-1063-1690), **Gorbakov M.E.**¹ – 4th year student (ORCID 0009-0009-6912-2413), **Kalimatova A.A.**¹ – 4th year student (ORCID 0009-0004-1478-8705), **Khripunkova D.S.**¹ – 4th year student (ORCID 0009-0008-3517-3776)

¹ FSBEI HE SPbSUVM

² Smorodintsev Influenza Research Institute

*tarlav1995@bk.ru

Financing: *The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 24-76-10044, <https://rscf.ru/project/24-76-10044>*

ABSTRACT

Within the framework of the Russian Science Foundation Grant No. 24-76-10044, a candidate vaccine strain of avian influenza virus A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) was obtained, which has a low-virulent phenotype due to replacement of the hemagglutinin cleavage site. This virus does not cause the death of developing chicken embryos during incubation and the clinical manifestation of the disease in animals upon infection.

The article presents the results of studies on the safety and harmlessness of a recombinant strain of avian influenza virus A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1). No hemorrhages or lesions were observed in embryos infected with the live recombinant virus. The data obtained indicate the safety of the A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 virus for embryonated chicken eggs. The study of harmlessness was carried out with intraperitoneal administration of an inactivated virus to white mice (this group also served as a control for inactivated drugs), and with the introduction of a virus inactivated with formalin, betapropiolactone and a mixture of theotropein and merthiolate. No significant weight loss was found in any of the observed groups, which indicates the harmlessness of the A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 strain for

white outbred mice, as well as the good tolerability of drugs obtained using all the studied inactivation schemes. The harmlessness of an inactivated vaccine made from the inactivated virus strain with the addition of aluminum hydroxide as an adjuvant was tested by studying changes in the live weight of one-day-old Dekalb White cross chickens. In all study groups, there were no signs of exhaustion, intoxication, or signs of disease, which indicates complete inactivation and harmlessness of the virus. An assessment of the vaccine's harmlessness was also carried out on ten 150-day-old Dominant chickens. After a 10-fold inoculation dose was injected into the pectoral muscle, the birds were monitored for 28 days. All chickens remained alive during the specified time, with no visible clinical signs of illness, and there were no signs of an inflammatory reaction at the injection site. Thus, it can be concluded that the A/Syktvykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) strain is safe, and inactivated vaccines made from this strain are completely harmless.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Борисов А.В. ФГУ «ВГНКИ» ВНИИЗЖ. Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульсионная. Патент № RU2323741C2. Россия, 2006 г.2
2. Джавадов Э.Д., Дмитриева М.Е. Грипп птиц. СПб, 2011.
3. Джавадов Э.Д., Хохлачев О.Ф., Новикова О.Б. [и др.] Изучение эффективности препарата Теотропин р⁺ в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц. Международный вестник ветеринарии, 2020, 3: 76-82 (doi: 10.17238/issn2072-2419.2020.3.76).
4. Киселев О.И., Цыбалова Л.М., Покровский В.И. Состояние разработки вакцин против вируса гриппа H5N1 в мире и России. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006 (5): 28–38.
5. Тарлавин Н.В., Веретенников В.В., Джавадов Э.Д. [и др.]. Сравнительный анализ кодирующих последовательностей пятого и седьмого сегмента генома вируса гриппа А подтипов H5N1, H7N9, H9N2. Ветеринария Кубани, 2023, 4: 3-5

(doi: 10.33861/2071-8020-2023-4-3-5).

6. Charostad J., Rukerd M.R.Z., Mahmoudvand S., Bashash D., Hashemi S.M.A., Nakhaie M., Zandi K. A comprehensive review of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1: An imminent threat at doorstep. Travel medicine and infectious disease. 2023 - Vol. 55.
7. Cui P., Shi J., Wang C., Zhang Y., Xing X., Kong H., Yan C., Zeng X., Liu L., Tian G., Li C., Deng G., Chen H. Global dissemination of H5N1 influenza viruses bearing the clade 2.3.4.4b HA gene and biologic analysis of the ones detected in China. Emerging microbes and infections, 2022, 11(1): 1693-1704 (doi: 10.1080/22221751.2022.2088407).
8. Neumann G, Ozawa M, Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza viruses. Methods in molecular biology, 2012, 865: 193-206 (doi: 10.1007/978-1-61779-621-0_12).
9. Zinyakov, N.; Andriyasov, A.; Zhestkov, P.; Kozlov, A.; Nikonova, Z.; Ovchinnikova, E.; Grekhneva, A.; Shcherbakova, L.; Andreychuk, D.; Sprygin, A.; et al. Analysis of Avian Influenza (H5N5) Viruses Isolated in the Southwestern European Part of the Russian Federation in 2020–2021. Viruses 2022, 14, 2725. <https://doi.org/10.3390/v14122725>.

REFERENCES

1. Borisov A.V. FGU "VGNKI" VNIIZH. Avian influenza vaccine is an inactivated emulsion vaccine. Patent No. RU2323741C2. Russia, 20062
2. Javadov E.D., Dmitrieva M.E. Avian influenza. St. Petersburg, 2011.
3. Javadov E.D., Khokhlachev O.F., Novikova O.B. [et al.] Study of the effectiveness of the drug Theotropin R⁺ against the main pathogens of bacterial diseases of birds. International Bulletin of America, 2020, 3:76-82 (doi:10.17238/issn2072-2419.2020.3.76).
4. Kiselev O.I., Kibalova L.M., Pokrovsky V.I. The state of development of a vaccine against the H5N1 influenza virus in the world and Russia. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology. 2006 (5): 28-38.
5. Tarlavin N.V., Veretennikov V.V., Jav-

- dov V.D. [et al.]. The government department coordinating the activities of this and other segments of the genome of influenza viruses is a variety of H5N1, H7N9, H9N2. Catherine Kuban, 2023, 4:3-5 (doi: 10.33861/2071-8020-2023-4-3-5).
6. Charostad J., Rukerd M.R.Z., Mahmudvand S., Bashash D., Hashemi S.M.A., Nahai M., Zandi K. Comprehensive overview of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1: an immediate threat at hand. Travel medicine and infectious diseases. 2023 - Volume 55.
7. Cui P., Shi J., Wang S., Zhang Y., Xing H., Kong H., Yang S., Zeng H., Liu L., Tian G., Li S., Deng G., Chen H. Global spread of H5N1 influenza viruses carrying the HA gene of clade 2.3.4.4b, and biological analysis of the detected viruses. in China. Emerging germs and infections, 2022, 11(1): 1693-1704 (doi: 10.1080/22221751.2022.2088407).
8. Neiman G., Ozawa M., Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza viruses. Methods in Molecular Biology, 2012, 865:193-206 (doi: 10.1007/978-1-61779-621-0_12).
9. Zinyakov, N.; Andriasov, A.; Zhestkov, P.; Kozlov, A.; Nikonova, Z.; Ovchinnikova, E.; Grekhneva, A.; Shcherbakova, L.; Andreychuk, D.; Sprygin, A.; and others . Analysis of avian influenza (H5N5) viruses isolated in the South-West of the European part of the Russian Federation in 2020-2021 Viruses 2022, 14, 2725. <https://doi.org/10.3390/v14122725> .