

Оригинальное исследование  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-646>



## Изучение патогенного потенциала и возможности межвидового перехода вирусов гриппа птиц подтипа H5, выявленных на территории России в 2018–2022 годах

Зиняков Н.Г., Грехнева А.Д.<sup>✉</sup>, Андриясов А.В., Овчинникова Е.В., Гусева Н.А., Козлов А.А., Никонова З.Б., Жестков П.Д., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.

Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир, Россия

### Аннотация

**Введение.** Высокая скорость эволюции вирусов высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП), обусловленная антигенным дрейфом и реассортацией, может привести к устойчивой репликации и передаче вируса млекопитающим, что наблюдается в популяциях животных в последние годы. Исследование маркеров патогенности для млекопитающих у циркулирующих вирусов ВПГП даёт возможность оценить их патогенный потенциал и способность к межвидовому переходу.

**Цель работы** — провести анализ геномных последовательностей изолятов вируса гриппа птиц (ВПГ) подтипа H5, выявленных на территории России в 2018–2022 гг.

**Материалы и методы.** В работе использованы результаты собственного полногеномного секвенирования и нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов ВПГ подтипа H5, опубликованные в открытых базах данных.

**Результаты.** Установлено, что преобладают вирусы с репликативным комплексом, адаптированным к размножению в клетках птиц. Анализ аминокислотной последовательности вирусного гемагглютинина выявил доминирование в рецептор-связывающем сайте белка аминокислот, характерных для ВПГ и обеспечивающих повышенное сродство к рецепторам SAα-2,3-Gal эпителиальных клеток птиц. Показано появление и распространение в популяции ВПГ факторов вирулентности для млекопитающих, таких как полноразмерный активный белок PB1-F2, дополнительная вставка из 5 аминокислот в белке NS1 и аминокислотные замены в белке M1.

**Заключение.** Наличие в популяции ВПГ факторов патогенности для млекопитающих может способствовать успешному межвидовому переходу вируса за счёт подавления отдельных элементов иммунной защиты с последующей адаптацией вирусного гемагглютинина к клеточным рецепторам млекопитающих в результате антигенного дрейфа с дальнейшим закреплением приобретённых мутаций естественным отбором. Элиминация из популяции ВПГ ряда адаптационных мутаций, способствующих размножению ВПГ в клетках млекопитающих, подтверждает эффективность стратегии стемпинг аут и запрета на вакцинацию в промышленном птицеводстве в качестве сдерживающего фактора для гриппа птиц как зооантропонозного заболевания.

**Ключевые слова:** грипп птиц, генетический анализ, аминокислотные замены, адаптационные мутации, межвидовой переход вируса

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Федерального центра охраны здоровья животных (протокол № 17 от 24.04.2023).

**Источник финансирования.** Работа выполнена за счёт средств гранта от Министерства образования и науки № 075-15-2021-1054 от 29.09.2021.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Зиняков Н.Г., Грехнева А.Д., Андриясов А.В., Овчинникова Е.В., Гусева Н.А., Козлов А.А., Никонова З.Б., Жестков П.Д., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. Изучение патогенного потенциала и возможности межвидового перехода вирусов гриппа птиц подтипа H5, выявленных на территории России в 2018–2022 годах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(3):350–361.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-646>  
EDN: <https://www.elibrary.ru/RWAMOM>

# Investigation of the pathogenic potential and the possibility of cross-species transmission of H5 avian influenza viruses detected on the territory of the Russian Federation in 2018–2022

Nikolay G. Zinyakov, Alena D. Grekhneva<sup>✉</sup>, Artem V. Andriyasov, Evgeniya V. Ovchinnikova, Nelli A. Guseva, Anton A. Kozlov, Zoya B. Nikonova, Pavel D. Zhestkov, Dmitry B. Andreychuk, Ilya A. Chvala

Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia

## Abstract

**Introduction.** The rapid evolution of highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses through antigenic drift and reassortment can lead to enhanced replication efficiency and cross-species transmission to mammals, as evidenced by recent outbreaks in various animal populations. Identifying mammalian pathogenicity markers in circulating HPAI viruses is crucial for evaluating their pathogenic potential and ability to cross species barriers.

**The aim.** This study analyzed genomic sequences of highly pathogenic H5 avian influenza virus (AIV) isolates collected in the Russian Federation between 2018 and 2022.

**Materials and methods.** We utilized original complete genome sequencing data alongside with nucleotide sequences of H5 AIV isolates and strains available in public databases.

**Results.** Analysis revealed a predominance of viruses with replication complexes adapted to avian cells. Examination of viral hemagglutinin amino acid sequences showed that most strains maintained receptor-binding sites of avian origin, with enhanced affinity for SA $\alpha$ -2,3-Gal receptors present in avian epithelial cells. However, we identified several mammalian virulence factors that have emerged and spread within the avian influenza virus population, including full-length active PB1-F2 protein, a 5-amino-acid insertion in the NS1 protein, and specific amino acid substitutions in the M1 protein.

**Conclusion.** The presence of mammalian pathogenicity factors in the avian influenza virus population may facilitate successful cross-species transmission through suppression of specific immune responses, followed by adaptation of viral hemagglutinin to mammalian cell receptors through antigenic drift and natural selection. The observed elimination of certain adaptive mutations from the avian influenza virus population validates the effectiveness of stamping-out policies and vaccination restrictions in industrial poultry farming as important measures to mitigate the zoonotic potential of avian influenza.

**Keywords:** *avian influenza, genetic analysis, amino acid substitutions, adaptive mutations, cross-species transmission of the virus*

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Federal Centre for Animal Health (protocol No. 17, April 24, 2023).

**Funding source.** The work was carried out at the expense of a grant from the Ministry of Education and Science No. 075-15-2021-1054 dated 09/29/2021.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Zinyakov N.G., Grekhneva A.D., Andriyasov A.V., Ovchinnikova E.V., Guseva N.A., Kozlov A.A., Nikonova Z.B., Zhestkov P.D., Andreychuk D.B., Chvala I.A. Investigation of the pathogenic potential and the possibility of cross-species transmission of H5 avian influenza viruses detected on the territory of the Russian Federation in 2018–2022. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(3):350–361.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-646>

EDN: <https://www.elibrary.ru/RWAMOM>

## Введение

Вирус гриппа птиц (ВГП) является возбудителем опасной высококонтагиозной болезни домашних и диких птиц, характеризующейся преимущественно поражением органов дыхания и пищеварительного тракта. В случае инфицирования вирусами высокопатогенного гриппа птиц (ВПП) подтипов H5 или H7 гибель птиц достигает 100%. В 1996 г.

в Китае был обнаружен вирус гриппа подтипа H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996, который впоследствии был признан основоположником генетической линии ВПП Gs/Gd/96. Со временем изоляты вирусов этой генетической линии получили широкое распространение не только в странах Азии, но и по всему миру. Так, с 2005 по 2007 г. вспышки болезни, вызванные этим подтипом вируса, нанесли зна-

чительный ущерб птицеводству России. С 2014 г. на территории России выявляли в том числе вирус ВПП подтипа H5N8, с 2016 г. — подтипа H5N5, с 2018 г. — подтипа H5N6. В 2018–2019 гг. вспышки ВПП (подтипы H5N1, H5N6 и H5N8) регистрировали среди дикой и домашней птицы в странах Азии и Африки, на территории России — в Центральном, Южном, Приволжском и Дальневосточном федеральных округах, в том числе у сельскохозяйственных птиц на птицефабриках (подтип H5N8). В 2020 г. ВПП H5N8 широко распространился в странах Европы и Ближнего Востока, на территории России и Казахстана [1, 2]. Кроме того, в Омской, Ростовской, Астраханской областях выявляли ВПП подтипа H5N5. В конце 2020 г. вирус H5N8 был выявлен у людей, контактировавших с больной птицей на птицефабрике Астраханской области [3, 4].

В 2021–2022 гг. широкое распространение получил ВПП подтипа H5N1 — вспышки болезни регистрировали в странах Европы, Азии, Африки и Северной Америки [4]. Большую озабоченность вызвали вспышки гриппа среди млекопитающих, таких как норки, лисицы, морские котики [5–9]. У выделенного вируса были обнаружены замены, которые указывают на адаптацию к размножению в организме млекопитающих. На настоящий момент ВПП на территории России представлен подтипом H5N1. В августе 2023 г. на территории острова Сахалин был обнаружен мертвый морской котик<sup>1</sup>, а исследование патологического материала от животного показало наличие ВПП подтипа H5N1.

Весной 2024 г. в США впервые выявили вирус ВПП H5N1 у коров на молочной ферме. Из клинических признаков наблюдались мастит, летаргия, снижение потребления корма, диарея и выделения из носа. С тех пор вирус был выявлен на молочных фермах не менее чем в 13 штатах США, также подтверждено выделение вируса в окружающую среду с молоком. Выявленный вирус отнесли к генетической кладе 2.3.4.4b и генотипу V3.13, циркулирующему у диких и домашних птиц на территории стран Северной Америки с 2021 г. [10, 11]. Через некоторое время вирус ВПП H5N1 был выявлен у больных и погибших кошек [12] и человека — работника молочной фермы. Вирус, идентифицированный в пробах от человека, имел аминокислотную замену в белке PB2 (*E627K*), которая связана с вирусной адаптацией к хозяевам-млекопитающим и ранее обнаружена у людей и других млекопитающих, инфицированных вирусами ВПП H5N1 и другими подтипами ВПП типа А, включая H7N9 и H9N2 [13]. Передача вируса ВПП от птиц к млекопитающим и затем доказанный межвидовой переход от коров к кошкам и человеку

указывают на существенную угрозу общественному здоровью.

Наличие у вируса гриппа типа А полиосновного сайта протеолитического расщепления белка гемагглютинина обеспечивает возможность обширного инфекционного процесса, затрагивающего различные органы и ткани, у разных видов животных. Возможность же репликации вируса и противодействие иммунному ответу организма хозяина обеспечивается другими вирусными белками. Ранее различными группами учёных были выявлены специфичные аминокислотные замены, которые обеспечивают возможность репликации в организме млекопитающих, противодействие иммунному ответу и более тяжёлое протекание инфекционного процесса [14–54].

**Целью** данной работы был анализ генома ВПП, выявленных на территории России, на наличие маркеров патогенности, потенциально способствующих преодолению вирусом межвидового барьера от птиц к млекопитающим и оценке патогенного потенциала циркулирующих вирусов как возбудителей зооантропонозного заболевания.

## Материалы и методы

### Биоматериал

В работе исследовали изоляты ВПП подтипа H5, выделенные из биоматериала от птиц в ВНИИЗЖ в 2018–2022 гг. В качестве материала использовали вирусосодержащую аллантоисную жидкость эмбрионов кур, свободных от патогенов, или, в случае невозможности выделения вирусов на эмбрионах кур, патологический материал от птиц (клоакальные и трахеальные смывы, 10–20% суспензии органов, приготовленные на основе 0,9% NaCl).

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Федерального центра охраны здоровья животных (протокол № 17 от 24.04.2023).

### Выделение РНК

Выделение суммарной РНК осуществляли с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

### Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили в одну стадию с помощью реагентов для амплификации («Синтол») и систем праймеров и зондов для амплификации фрагментов генов *MP* и *HA*.

<sup>1</sup> World Organisation for Animal Health. Event 5191. <https://wahis.woah.org/#/in-event/5191/dashboard>

Реакцию ОТ проводили в две стадии (отжиг праймеров и непосредственно ОТ) с использованием набора реактивов «Maxima H Minus Reverse Transcriptase» (включает RT-буфер и ревертазу Maxima H; «Thermo Fisher Scientific»), ингибитора РНКаз «RiboLock RNase Inhibitor» («Thermo Fisher Scientific»), раствора dNTPs («Синтол»), бидистиллированной воды, свободной от РНКаз, и раствора прямых специфичных сегмент-универсальных праймеров для амплификации всех сегментов ВГП типа А. Классическую ПЦР проводили с использованием реагентов для амплификации («Синтол») и системы специфичных сегмент-универсальных праймеров для амплификации всех сегментов ВГП типа А. Очистку продуктов ПЦР из ПЦР-смеси осуществляли с помощью набора «Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System» («Promega»).

### Секвенирование

Полногеномное секвенирование проводили с помощью генетического анализатора «MiSeq» («Illumina») в соответствии с инструкцией к прибору. Для приготовления библиотек использовали коммерческие наборы «Nextera XT» и «Nextera XT Index Kit» («Illumina»).

### Нуклеотидные последовательности

В работе использованы результаты собственного полногеномного секвенирования и нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов ВГП подтипа Н5 из России, опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI<sup>2</sup> и на платформе EpiFlu<sup>3</sup> (см. Приложение на сайте журнала <https://microbiol.crie.ru/jour>).

Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы «BioEdit v. 7.0.5.3». Последовательности выравнивали с помощью программы множественного выравнивания «ClustalW». Филогенетическое дерево строили по алгоритму NJ в реализации пакета «MEGA v. 7.06».

### Результаты

В результате исследований, проведённых в 2018–2022 гг. и охвативших все федеральные округа РФ, специалистами ВНИИЗЖ были выявлены 1082 пробы, содержавшие генетический материал ВГП подтипа Н5 (табл. 1).

ВГП подтипа Н5 на протяжении всего срока исследования выявляли преимущественно в пробах от домашних птиц (табл. 1). Часть вирусов (45) была подвергнута полногеномному секвенированию с целью изучения эволюции вирусов и характеристики их биологических свойств, выборка состав-

лена на основе географического распространения и различий в подтипах вируса по нейраминидазе. Для расширения исследуемой выборки были импортированы доступные в открытых базах данных полногеномные последовательности ВГП подтипа Н5, выявленные на территории России с 2018 по 2022 г. (134 изолята). Необходимо сделать акцент на том, что в отношении ВГП, который в течение одного сезона миграции дикой птицы способен распространяться на огромные территории, использование терминов «популяция», «циркуляция вируса» не является корректным. В данном случае под термином «популяция вируса гриппа птиц» будет пониматься набор из 179 вирусов, выявленных на территории России в 2018–2022 гг., для которых были получены полногеномные последовательности. Термин «популяция ВГП» не подразумевает заявления о наличии на территории России очагов стойкого неблагополучия и длительной циркуляции ВГП.

На основании анализа предсказанной аминокислотной последовательности был определён сайт расщепления вирусного гемагглютинина сравниваемых изолятов. Для всех вирусов он имел сходную структуру, содержащую 6 основных аминокислот с вариацией по позиции 342 — RE(K/R)RRKR. Исключение составил вирус A/dalmatian pelican/Astrakhan/417-1/2021 (H5N5), сайт нарезания которого содержал 7 основных аминокислот RKKRRKR. В рецептор-связывающей части вирусного белка у всех вирусов обнаружен аминокислотный мотив G<sub>225</sub>QRG<sub>228</sub> (по нумерации подтипа Н3).

Вирусы ВГП подтипа Н5 способны инфицировать млекопитающих, в том числе человека, несмотря на то что их гемагглютинин преимущественно взаимодействует с клеточными рецепторами SA $\alpha$ -2,3-Gal. Однако в случае успешной репродукции ВГП в клетках млекопитающих исследователями были выявлены мутации в других вирусных генах, которые рассматриваются как маркеры адаптации ВГП для размножения в организме млекопитающих. По фенотипическому проявлению маркерные замены можно разделить на две основ-

**Таблица 1.** Результаты исследования проб на наличие генома ВГП подтипа Н5 на территории России с 2018 по 2022 г.

Год	Количество исследованных проб	Количество проб, содержавших ВГП/Н5	
		от домашних птиц	от диких птиц
2018	2749	208	0
2019	5558	2	0
2020	6288	222	27
2021	6418	297	56
2022	6087	250	20
Сумма	27 100	979	103

<sup>2</sup> URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

<sup>3</sup> URL: <https://www.gisaid.org/>

**Таблица 2.** Маркерные аминокислотные замены, связанные с адаптацией к размножению ВГП в КК млекопитающих

Белок	Номер позиции аминокислоты и изоляты ВГП, содержащие мутации	Фенотипическое проявление мутации
PB1	622G — все исследованные вирусы	Повышение активности полимеразы [39]
	678S — все исследованные вирусы, за исключением: 678N — A/turkey/Rostov-on-Don/332-XX/2021, 678G — A/dabchick/Tyva/767-58/2021	678N — повышение активности полимеразы [19]
PB2	89V, 309D, 339K, 477G — все исследованные вирусы, 495V//A, 676T//M/A	Совокупность мутаций: 89V, 309D, 339K, 477G, 495V, 676T — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих [15]
	292I/T, 588A — все исследованные вирусы, за исключением: 292V — H5N8 2018–2020 (кроме кур из Новосибирска в 2020 г.), A/chicken/Kostroma/1761-1 (H5N8), A/chicken/Tomsk/1797-7/20 (H5N8), A/duck/KChR/1590-14/20 (H5N8), A/crow/Khabarovsk/2712-1/2022 (H5N1), A/dabchick/Tyva/767-58/2021 (H5), 588V, A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6)	292V, 588V — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих, повышенная вирулентность для мышей [40]
PB2	389R, 598T — все исследованные вирусы	389R, 598T — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих при низких температурах [41]
	482K — все исследованные вирусы, за исключением: 482R, A/chicken/Kostroma/304-XX/2020 (H5N8), A/chicken/Kostroma/1761-1 (H5N8), A/crow/Khabarovsk/776-56/22 (H5N1), A/duck/Magadan/2272-8/2022 (H5N1), A/goose/Magadan/2272-5/22 (H5N1), A/poultry/Magadan/1560-1/2022 (H5N1)	482R — повышение активности полимеразы в КК млекопитающих [42]
PA	37A, 100V — все исследованные вирусы, за исключением: 37S, A/turkey/Stavropol/165-5/2022	37A, 100V — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих, повышенная вирулентность для мышей [18]
	97T — все исследованные вирусы, за исключением: 97I, A/Chicken/Ryazan/1093-1/2022 (H5N1), A/Poultry/Samara/1659-1/2022 (H5N1), A/Poultry/Samara/1643-1/2022 (H5N1), A/Chicken/Kursk/1281-1/2022 (H5N1), A/Goose/Saratov/1965-1/2022 (H5N1), A/Goose/Belgorod/1498-1/2022 (H5N1), A/Duck/Ivanovo/1462-3/2022 (H5N1), A/Duck/Belgorod/1482-10/2022 (H5N1), A/Chicken/Orel/1484-5/2022 (H5N1), A/Chicken/Kaluga/1424-2/2022 (H5N1), A/Chicken/Rostov/1724-2/2022 (H5N1)	97I — повышение активности полимеразы и реплика- ции в КК млекопитающих, увеличение вирулентности для мышей [43]
PA	127V, 44V, 241C, 343A, 573I — все исследованные вирусы, за исключением: 127A — все вирусы H5N8/2018	127A, 44I, 241Y, 343T, 573V — повышенная реплика- ция в КК млекопитающих, увеличение вирулентности для мышей [16]
	343A, 347D — все исследованные вирусы, за исключением: 343T — A/Crow/Khabarovsk/2712-1/2022 (H5N1), 343S — вирусы H5N5 и H5N8, циркулировавшие в 2020–2021 гг.	343S, 347E — повышенная репликация в КК млекопи- тающих, увеличение вирулентности для мышей [44]
PA	142K, 147I, 171I, 182M — все исследованные вирусы, 142R, A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6), 182L, A/waterfowl/Russia/1526-4/2021 (H5N5), A/shelduck/Kalmykia/1814-1/2021 (H5N5)	142R, 147V, 171V, 182L — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих [45]
	224S/A — все исследованные вирусы, 383D — все исследованные вирусы	224P, 383D — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих [17]
NP	41I — все исследованные вирусы, за исключением: 41V — A/common teal/Chelyabinsk/1379-1/2021 (H5N1)	41V — повышение активности полимеразы в КК млекопитающих при низкой температуре [46]
NS1	3P/S, 41K, 74D — все исследованные вирусы, за исключением: 41R — A/chicken/Tomsk/1797-7/20 (H5N8)	3S, 41K, 74N — усиленная репликация в КК млекопитающих и патогенность для мышей [47]
	55E, 66E, 138F — все исследованные вирусы, за исключением: 66K — вирусы H5N8 2020–2021 138L A/goose/Omsk/3003/2020 (H5N8) A/goose/Omsk/3008/2020 (H5N8)	55E, 66E, 138F — усиленная репликация в КК млекопитающих, снижение реакции на интерферон [48]

ные группы: мутации, связанные с повышением активности вирусного полимеразного комплекса в культуре клеток (КК) млекопитающих; мутации, усиливающие вирулентные свойства вируса при экспериментальном заражении лабораторных мышей и вызывающие изменение метаболизма на уровне организма, связанное с модификацией иммунного ответа в организме хозяина. В анализ были включены аминокислотные замены, для которых экспериментально было показано изменение биологических свойств вируса и установлена связь между мутацией и её фенотипическим проявлением. В **табл. 2** указаны позиции замен аминокислот белков ВГП, способствующие репродукции ВГП в организме млекопитающих.

Анализ предсказанной аминокислотной последовательности белков полимеразного комплекса выявил единичные маркерные замены, способные усиливать работу репликативного комплекса вируса в клетках млекопитающих, которые закрепились в популяции ВГП. Так, в белке PB1 закрепились лишь 1 замена в положении 622G. Две другие мутации (678N и 105S) имели единичное распространение.

В белке PB2 естественным отбором произошло закрепление мутаций 389R и 598T. Данные мутации среди ВГП регистрировались и ранее, но в настоящее время стали доминирующими. Отмечено широкое распространение в 2018–2020 гг. мутации 292V, появление в популяции единичных мутаций 482R. Анализ набора «адаптационных мутаций» 89V, 309D, 339K, 477G, 495V, 676T свидетельствует о закреплении естественным отбором этого набора аминокислотных замен. Экспериментальные исследования показали, что совокупность данных замен способна компенсировать отсутствие лизина в по-

зиции 627 белка PB2 для успешного размножения ВГП в клетках млекопитающих [15].

Анализ предсказанной аминокислотной последовательности гена PA показал, что в популяции произошло закрепление мутации 383D. Выявлено широкое распространение мутаций 37A, 61I, 63V, 100V, 343S, 383D и единичные случаи мутаций 224P, 343T, 142R. Несмотря на то что в нуклеотидных последовательностях гена PA обнаружено наибольшее число «адаптационных мутаций», это не представляется критичным, поскольку они случайным образом распределены среди вирусов. Кроме того, ряд выполненных исследований показал необходимость синергического эффекта для фенотипического проявления у млекопитающих «адаптационных мутаций» в гене PA [16–18].

Анализ маркерных аминокислотных замен, связанных с вирулентными свойствами ВГП, показал, что в популяции ВГП закрепились мутация 42S в белке NS1 (**табл. 3**). Данная замена является маркером вирулентных свойств для мышей и способна противодействовать индукции интерферона в клетке-хозяине, а также предотвратить активацию пути NF-κB при иммунном ответе [19]. Кроме этого, у всех изолятов были выявлены аминокислотные замены 30D и 215A в белке M1, признанные детерминантами патогенности для мышей [20].

При изучении факторов патогенности отмечено закрепление в популяции ВГП гена NS1, кодирующего соответствующий белок с дополнительной вставкой из 5 аминокислот в позиции 80–84. Экспериментальные исследования показали, что гибридные вирусы, имеющие данную вставку, могут вызывать в организме гипериммунный ответ — так называемый «цитокиновый шторм» [21]. Проведён-

**Таблица 3.** Маркерные аминокислотные замены, связанные с повышенной вирулентностью ВГП

Белок	Номер позиции аминокислоты и изоляты ВГП, содержащие мутации	Фенотипическое проявление мутации
PB1	105S — A/chicken/Penza/300/2018	Увеличение вирулентности у мышей [43]
PB1-F2	66N — все исследованные вирусы, за исключением: 66S — изоляты ВГП 2019–2022 подтипов H5N5, H5N1 319N — все исследованные вирусы, за исключением: 319K	66S — вирулентность и усиление иммунного ответа для мышей [34, 54]
NP	A/Crow/Khabarovsk/776-56/22 (H5N1) A/Duck/Magadan/2272-8/2022 (H5N1) A/Goose/Magadan/2272-5/22 (H5N1) A/Poultry/Magadan/1560-1/2022 (H5N1) A/Chicken/Ryazan/1093-1/2022 (H5N1)	319K — нарушение внутриядерного транспорта в клетках млекопитающих [23]
M1	30D, 215A — все исследованные вирусы 43M — все исследованные вирусы	30D, 215A — увеличение вирулентности у мышей Увеличение вирулентности у мышей [49]
NS1	42S — все исследованные вирусы 92D — все исследованные вирусы, за исключением: 92E, A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) 103F/Y, 106M — все исследованные вирусы	Повышенная вирулентность и снижение противовирусного ответа для мышей [50] 92D — повышенная вирулентность для свиней и мышей [51] 103F, 106M — повышенная вирулентность для мышей [52, 53]

ный анализ показал, что среди вирусов гриппа данная мутация стала закрепляться после 2017 г.

### Обсуждение

В результате проведенной работы установлено закрепление эволюционным отбором ряда аминокислотных замен, способствующих успешному размножению ВГП в организме млекопитающих. При этом остаются вопросы о механизме функционирования вирусного рецептора, который позволяет вирусу осуществлять межвидовой переход. Согласно ранее проведенным исследованиям, аминокислотный мотив  $G_{225}QRG_{228}$  характерен для вирусов гриппа, выделенных от птиц, и обладает высокой аффинностью к рецепторам группы SA $\alpha$ -2,3-Gal [14, 22]. Однако интерпретация аффинных свойств вирусного гемагглютинина к рецепторам группы SA $\alpha$ -2,3-Gal или к рецепторам группы SA $\alpha$ -2,6-Gal по первичной аминокислотной последовательности затруднительна. Установлено, что изменение тропных свойств вирусов гриппа возможно в результате возникновения как единичных мутаций, так и целого набора мутаций в аминокислотной последовательности. В наших неопубликованных исследованиях и данных литературы по сравнительному анализу предсказанной аминокислотной последовательности гена *HA* вирусов, выделенных от птиц и млекопитающих, не выявлено аминокислотных замен, которые были бы характерны только для ВГП или только для вирусов, выделенных от млекопитающих. По всей видимости, гемагглютинин вируса гриппа генетической клады 2.3.4.4 в результате единичных мутаций способен менять свои аффинные свойства в отношении остатков сиаловых кислот и, сохраняя функциональность, может преодолевать межвидовой барьер, сочетаясь с различными типами вирусной нейраминидазы.

У ВГП, выделенных в промышленном хозяйстве в Ростовской области, — A/turkey/Rostov-on-Don/332-XX/2021 в белке PB1 обнаружена мутация 678N; на территории Республики Тыва выявлен вирус A/dabchick/Tyva/767-58/2021 с мутацией 678G. Согласно экспериментальным данным, сочетание аминокислот 13P и 678N вызывает резкое увеличение полимеразной активности ВГП при размножении в клетках млекопитающих [19]. У изолята A/chicken/Penza/300/2018 выявлена мутация 105S, усиливающая проявление вирулентных свойств в отношении мышей. Для проверки происхождения данных мутаций был выполнен филогенетический анализ, который показал, что вирусы A/turkey/Rostov-on-Don/332-08/2021, A/dabchick/Tyva/767-58/2021 и A/chicken/Penza/300/2018 находятся в группах, включающих вирусы, распространившиеся на территории России в период с 2018 по 2022 г. и не имевшие подобных мутаций (рисунк). Филогенетический анализ подтверждает, что появление мутаций 105S,

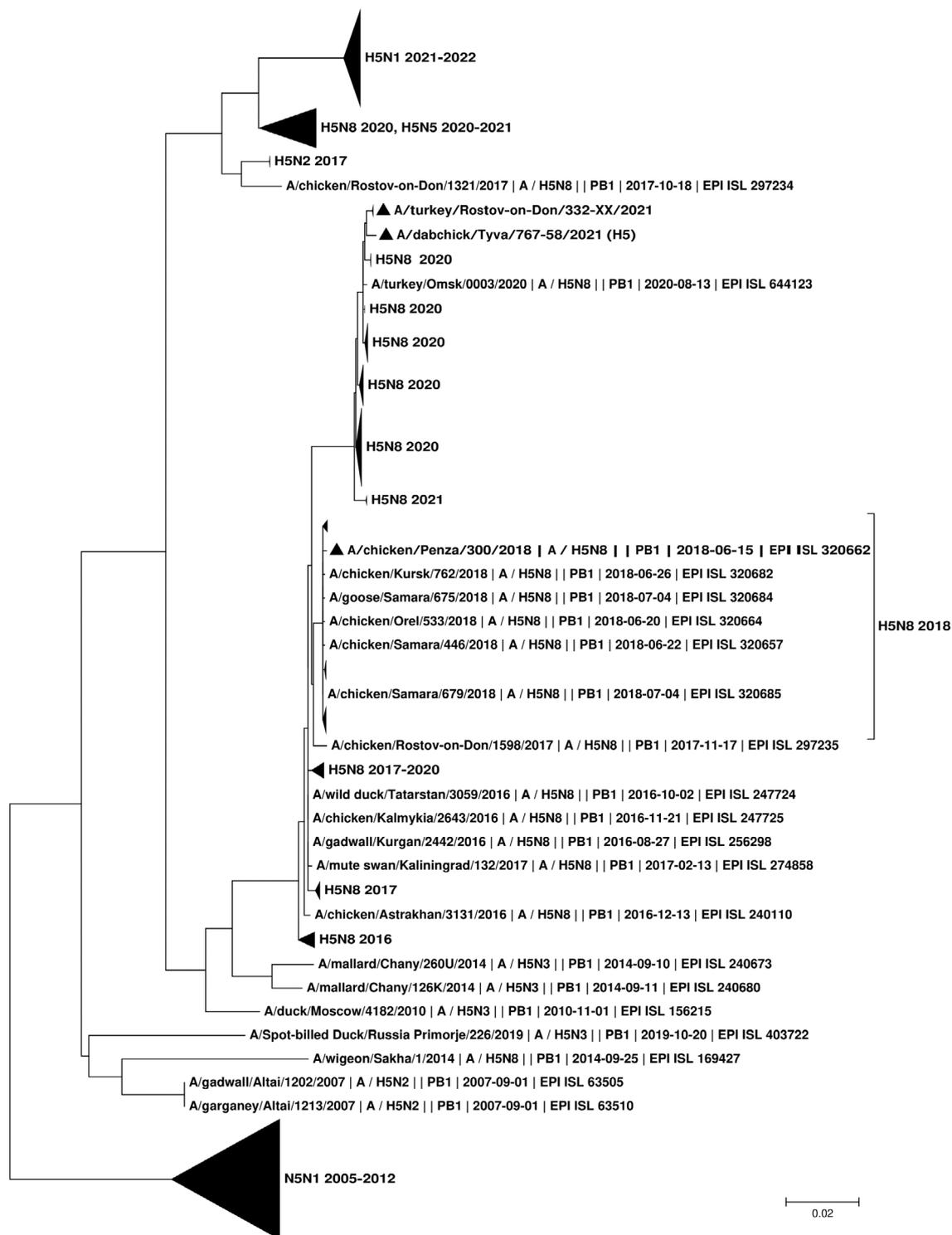
678N, 678G в белке PB1 среди ВГП, выявленных на территории России, является результатом антигенного дрейфа, а не антигенного шифта.

Анализ возникновения замен в репликативных белках ВГП (на примере мутаций 678N и 105S белка PB1) показал, что возникновение единичных мутаций в результате антигенного дрейфа происходит крайне редко даже в условиях частых эпизоотий. Единичное и незначительное распространение в популяции ВГП мутаций, способствующих развитию болезни у млекопитающих в случае межвидового перехода, демонстрирует целесообразность и эффективность стратегии стемпинг-аут в борьбе с гриппом птиц как болезни с зооантропонозным потенциалом. Применение стратегии стемпинг-аут, подразумевающей тотальное уничтожение всех инфицированных животных, рекомендовано Всемирной организацией здоровья животных для ряда эмерджентных болезней, обладающих панзоотическим потенциалом и способных сохраняться в популяциях диких животных. При надлежащем надзоре за поголовьем сельскохозяйственной птицы с использованием методов молекулярной биологии можно своевременно выявлять ВГП и проводить ликвидацию очага, не допуская возможности межвидового перехода к млекопитающим. Эффективность стратегии стемпинг-аут подтверждает исчезновение из вирусной популяции таких мутаций, как 127A в белке PA и 292V в белке PB2. Эти мутации были выявлены у вирусов в период эпизоотии ВГП подтипа H5N8 2018 г. Мутация 292V в белке PB2 в единичных случаях была зарегистрирована и после 2018 г., однако своевременное уничтожение инфицированного поголовья не позволило ВГП проникнуть в популяцию млекопитающих. Из популяции ВГП эти мутации были отсеяны естественным отбором, поскольку имели негативный эффект для размножения вируса в организме птиц. По всей видимости, в популяциях ВГП существует динамическое равновесие, поддерживаемое естественным отбором, благодаря чему адаптационные мутации к млекопитающим исчезают из популяции. Это можно наблюдать на примере разброса подобных мутаций по различным генам среди ВГП — они встречаются у различных вирусов с разной частотой, но не было обнаружено вирусов, которые бы содержали в своем геноме полный спектр адаптационных мутаций к млекопитающим. Кроме этого, у изученных нами вирусов выявлены новые замены в позициях, изменения в которых влияют на репликацию в клетках млекопитающих (табл. 3).

Влияние новых мутаций на репликацию и вирулентные свойства ВГП в отношении млекопитающих экспериментально не изучено. Несмотря на отсутствие экспериментальных данных, указывающих на усиление репликации вируса от новых замен, это внушает опасение, поскольку ранние работы по

эволюции ВГП показали, что, преодолевая видовой барьер, он проходит фазу, позволяющую постепенно приобретать адаптивные мутации, не теряя приспособленности к старому хозяину [23, 24]. Ранее проведённые исследования по изучению трансмиссивности ВГП, выполненные другими ис-

следователями, указывают на сложный и зачастую комплексный характер изменений в геноме ВГП при межвидовом переходе и закреплении вируса в популяции нового вида [25–28]. Исследования, выполненные в НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, также показали возмож-



Филогенетическое дерево, построенное методом NJ на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена *PB1* (1–2275 п.н. ORF) ВГП подтипа H5. Треугольниками отмечены ВГП с адаптивными мутациями.

ность адаптации и приобретения ВГП патогенных свойств для лабораторных мышей в течение 7–10 циклов экспериментального заражения [29].

В нашем анализе, кроме единичных замен, отмечено, что в популяции ВГП после 2020 г. на территории России закрепились вирусы, способные транслировать полноразмерный белок PB1-F2. Трансляция стала возможна благодаря нуклеотидной мутации *A129C* (нумерация от начала открытой рамки считывания гена *PB1*), ликвидировавшей стоп-кодон. Ген *PB1-F2* находится внутри рамки считывания гена *PB1* и кодирует белок, влияющий на тяжесть воспалительного процесса. В настоящее время однозначного описания влияния данного белка на вирулентные свойства вируса нет. Достоверно известно, что фенотипическое проявление одной и той же формы гена *PB1-F2* различается у птиц и млекопитающих. Уже было показано, что экспрессия *PB1-F2* снижает вирулентность для птиц [30–32]. По результатам экспериментального заражения установлено, что в то время как при заражении птиц не было замечено усиления вирулентности, заражение мышей выявило явное участие белка PB1-F2 вируса H7N1 в воспалительной реакции организма хозяина, как ранее было показано для штаммов ВГП подтипов H1N1 и H5N1 [32]. Результаты экспериментального заражения у хорьков при заражении ВГП с экспрессией PB1-F2 отличались от течения инфекционного процесса при использовании вируса без экспрессии PB1-F2. Заражение вирусом, экспрессирующим PB1-F2, коррелировало со значительным нарушением регуляции числа лейкоцитов на 3-й и 7-й дни после заражения; экспрессия PB1-F2 была связана как с лимфопенией, так и с повышенным количеством нейтрофилов. Лимфопения у всех хорьков была проходящей, и уровни лейкоцитов возвращались к исходному значению на 19-й день после заражения [33]. Все вирусы с активной формой гена *PB1-F2* имеют аминокислотную мутацию *66S*. В ряде исследований показано, что вирусы с данной мутацией вызывали более тяжёлый инфекционный процесс среди инфицированных лабораторных мышей [34]. Данная мутация была у ВГП, выделенных от норок в Испании в 2022 г. [5]. Кроме этого, данная мутация была одной из тех, что отличали смертоносный вирус A/Brevig Mission/18, так называемый «испанский грипп», полыхавший в начале XX столетия по всему миру [34]. Помимо непосредственного воздействия белка PB1-F2 на протекание инфекционного процесса, получены данные, которые указывают на возможность более тяжёлого инфекционного процесса при взаимной экспрессии полноразмерных белков PB1-F2 и PA-X [35]. Проведённый анализ показал, что все исследованные в данной работе ВГП способны экспрессировать полноразмерный белок PA-X.

Отдельно стоит обратить внимание на варибельность С-концевой последовательности белка NS1. Ранее проведённые работы показали, что единичные замены в 4 последних аминокислотах влияют на возможность эффективного межвидового перехода от свиней к мышам, сопровождающегося проявлением патогенных свойств в отношении нового хозяина [36]. Так, ВГП подтипа H1N1, имевшие в своем составе белок NS1, где последние 4 аминокислоты были PEQK и RSEV, не могли инфицировать мышей, тогда как тот же вирус, чей белок NS1 заканчивался аминокислотным мотивом GSEI и EPEV, успешно индуцировал инфекционный процесс у мышей, достигая титра 2300 БОЕ/г [37]. Среди ВГП, выявленных на территории России за 2018–2022 гг., концевой мотив белка NS1 имел вариации GSEV, LPPK, FPPK, ESEV, ESEI. Подобное разнообразие концевой мотивы белка NS1 может обеспечивать широкое распространение ВГП среди различных видов птиц [38].

Полученные в результате анализа наличия маркерных замен у ВГП/H5 данные указывают на активный эволюционный процесс, происходящий в настоящее время в популяции ВГП. Наличие в популяции ВГП факторов патогенности для млекопитающих может способствовать успешному межвидовому переходу вируса за счёт подавления отдельных элементов иммунной защиты. После межвидового перехода вирус может оказаться в русле «накопительной» изменчивости, когда в процессе естественного отбора закрепляются единичные мутации, усиливающие фенотипическое проявление или функциональные свойства отдельных белков и предоставляющие конкурентные преимущества относительно других вирусов.

Подобный сценарий межвидового перехода подчёркивает необходимость использования стратегии стемпинг-аут и запрета на вакцинацию против ВГП в промышленном птицеводстве в качестве сдерживающего фактора для ВГП как возбудителя зооантропонозного заболевания. Своевременное и полное уничтожение инфицированного поголовья птицы позволяет избежать межвидового перехода ВГП к млекопитающим через бродячих собак, кошек или мелких грызунов. В случае бесконтрольной вакцинации против ВГП может происходить скрытая циркуляция ВГП среди восприимчивого поголовья без проявления клинических признаков, результатом которой будет увеличение генетического разнообразия популяции ВГП и активное появление новых мутаций, в числе которых могут оказаться и «полезные» для вируса, способствующие межвидовому переходу.

### Заключение

В результате проведённых исследований установлено, что среди ВГП подтипа H5, выявлен-

ных на территории России в 2018–2022 гг., преобладали вирусы с ферментативным комплексом, адаптированным к репликации в клетках птиц. Адаптационные мутации к репликации в клетках млекопитающих единичны и хаотично распределены в популяции вируса. Вирусный гемагглютинин обладает аффинностью преимущественно к клеточным рецепторам птиц. Показано появление и распространение в популяции ВГП факторов вирулентности для млекопитающих. Наличие таких факторов может способствовать успешному межвидовому переходу вируса с последующей адаптацией вирусного гемагглютинина к клеточным рецепторам млекопитающих в результате антигенного дрейфа и закрепления новых мутаций в ходе естественного отбора.

Полученные результаты указывают на эффективность стратегии стемпинг-аут и запрета на вакцинацию против ВГП в промышленном птицеводстве в качестве сдерживающего фактора для ВГП как возбудителя зооантропонозного заболевания. Своевременное и полное уничтожение поголовья птицы, инфицированной ВГП, способным в процессе размножения продуцировать факторы патогенности для млекопитающих и обладающим отдельными адаптационными мутациями в репликативных белках, позволяет избежать или значительно снизить вероятность межвидового перехода ВГП от птиц к млекопитающим через бродячих животных или мелких грызунов.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Марченко В.Ю., Гончарова Н.И., Тран Т.Н. и др. Обзор эпизоотологической ситуации по высокопатогенному вирусу гриппа птиц в России в 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(2):31–7. Marchenko V.Yu., Goncharova N.I., Tran T.N., et al. Overview of the epizootiological situation on highly pathogenic avian influenza virus in Russia in 2019. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(2):31–7. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-31-37> EDN: <https://elibrary.ru/rmioio>
2. Lewis N.S., Banyard A.C., Whittard E., et al. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020. *Emerg. Microbes Infect.* 2021;10(1):148–51. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1872355>
3. Виткова О.Н., Караулов А.К., Ирза В.Н. и др. Эпизоотическая ситуация по высокопатогенному гриппу птиц и болезни Ньюкасла в Российской Федерации в 2016–2020 годах. *Эффективное животноводство*. 2021;(4):76–8. Vitkova O.N., Karaulov A.K., Irza V.N., et al. Epizootic situation of highly pathogenic avian influenza and Newcastle disease in the Russian Federation in 2016–2020. *Efficient Animal Husbandry*. 2021;(4):76–8. EDN: <https://elibrary.ru/utlbye>
4. Ирза В.Н., Волков М.С., Варкентин А.В. О текущей панзоотии высокопатогенного гриппа птиц. *Эффективное животноводство*. 2022;(5):85–6. Irza V.N., Volkov M.S., Varkentin A.V. About the current epizootic of highly pathogenic avian influenza. *Efficient Animal Husbandry*. 2022;(5):85–6. EDN: <https://elibrary.ru/rcsitl>
5. Agüero M., Monne I., Sanchez A., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection in farmed minks, Spain, October 2022. *Euro Surveill*. 2023;28(3):2300001. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.3.2300001>
6. Honglei S., Fangtao L., Qingzhi L., et al. Mink is a highly susceptible host species to circulating human and avian influenza viruses. *Emerg. Microbes Infect.* 2021;10(1):472–80. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1899058>
7. Bordes L., Vreman S., Heutink R., et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) show neurotropism and adaptive virus mutations. *Microbiol. Spectr.* 2023;11(1):e0286722. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02867-22>
8. Floyd T., Banyard A.C., Lean F.Z., et al. Encephalitis and death in wild mammals at a rehabilitation center after infection with highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2021;27(11):2856–63. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2711.211225>
9. Postel A., King J., Kaiser F.K., et al. Infections with highly pathogenic avian influenza A virus (HPAIV) H5N8 in harbor seals at the German North Sea coast. *Emerg. Microbes Infect.* 2022;11(1):725–9. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2043726>
10. Rodriguez Z., Picasso-Risso C., O'Connor A., Ruegg P.L. Hot topic: epidemiological and clinical aspects of highly pathogenic avian influenza H5N1 in dairy cattle. *JDS Commun.* 2024;5(Suppl. 1):S8–12. DOI: <https://doi.org/10.3168/jdsc.2024-0650>
11. Butt S.L., Nooruzzaman M., Covalada L.M., Diel D.G. Hot topic: influenza A H5N1 virus exhibits a broad host range, including dairy cows. *JDS Commun.* 2024;5(Suppl. 1):S13–9. DOI: <https://doi.org/10.3168/jdsc.2024-0638>
12. Burrough E.R., Magstadt D.R., Petersen B., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) clade 2.3.4.4b virus infection in domestic dairy cattle and cats, united states, 2024. *Emerg. Infect. Dis.* 2024;30(7):1335–43. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid3007.240508>
13. Uyeki T.M., Milton S., Abdul Hamid C., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection in a dairy farm worker. *N. Engl. J. Med.* 2024;390(21):2028–9. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMc2405371>
14. Gabriel G., Abram M., Keiner B., et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*. 2006;312(5772):404–10. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1124513>
15. Li J., Ishaq M., Prudence M., et al. Single mutation at the amino acid position 627 of PB2 that leads to increased virulence of an H5N1 avian influenza virus during adaptation in mice can be compensated by multiple mutations at other sites of PB2. *Virus Res.* 2009;144(1-2):123–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.04.008>
16. Yamaji R., Yamada S., Le M.Q., et al. Mammalian adaptive mutations of the PA protein of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus. *J. Virol.* 2015;89(8):4117–25. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03532-14>
17. Song J., Xu J., Shi J., et al. Synergistic effect of S224P and N383D substitutions in the PA of H5N1 avian influenza virus contributes to mammalian adaptation. *Sci. Rep.* 2015;5:10510. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep10510>
18. Hu M., Yuan S., Ye Z.W., et al. PA<sub>N</sub> substitutions A37S, A37S/I61T and A37S/V63I attenuate the replication of H7N7 influenza A virus by impairing the polymerase and endonuclease activities. *J. Gen. Virol.* 2017;98(3):364–73. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000717>
19. Gabriel G., Dauber B., Wolff T., et al. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005;102(51):18590–5. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0507415102>

20. Fan S., Deng G., Song J., et al. Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Virology*. 2009;384(1):28–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.044>
21. Chen S., Miao X., Huangfu D., et al. H5N1 avian influenza virus without 80–84 amino acid deletion at the NS1 protein hijacks the innate immune system of dendritic cells for an enhanced mammalian pathogenicity. *Transbound. Emerg. Dis.* 2021;68(4):2401–13. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13904>
22. Matrosovich M.N., Gambaryan A.S., Teneberg S., et al. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology*. 1997;233(1):224–34. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8580>
23. Gabriel G., Herwig A., Klenk H.D. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e11. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040011>
24. Gabriel G., Abram M., Keiner B., et al. Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus. *J. Virol.* 2007;81(17):9601–4. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00666-07>
25. Imai M., Watanabe T., Hatta M., et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*. 2012;486(7403):420–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10831>
26. Russell C.A., Fonville J.M., Brown A.E., et al. The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host. *Science*. 2012;336(6088):1541–7. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1222526>
27. Herfst S., Schrauwen E.J., Linster M., et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*. 2012;336(6088):1534–41. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1213362>
28. Herfst S., Imai M., Kawaoka Y., Fouchier R.A.M. Avian influenza virus transmission to mammals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014;385:137–55. DOI: [https://doi.org/10.1007/82\\_2014\\_387](https://doi.org/10.1007/82_2014_387)
29. Timofeeva T.A., Rudneva I.A., Lomakina N.F., et al. Mutations in the genome of avian influenza viruses of the H1 and H5 subtypes responsible for adaptation to mammals. *Microbiol. Indep. Res. J.* 2021;8(1):80–91. DOI: <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2021-8-1-50-61>
30. Leymarie O., Embury-Hyatt C., Chevalier C., et al. PB1-F2 attenuates virulence of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus in chickens. *PLoS One*. 2014;9(6):e100679. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100679>
31. James J., Howard W., Iqbal M., et al. Influenza A virus PB1-F2 protein prolongs viral shedding in chickens lengthening the transmission window. *J. Gen. Virol.* 2016;97(10):2516–27. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000584>
32. Mettler J., Marc D., Sedano L., et al. Study of the host specificity of PB1-F2-associated virulence. *Virulence*. 2021;12(1):1647–60. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1933848>
33. Hai R., Schmolke M., Varga Z.T., et al. PB1-F2 expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza virus has minimal impact on virulence in animal models. *J. Virol.* 2010;84(9):4442–50. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02717-09>
34. Conenello G.M., Zamarin D., Perrone L.A., et al. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog.* 2007;3(10):1414–21. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030141>
35. Ma J., Li S., Li K., et al. Effects of the PA-X and PB1-F2 proteins on the virulence of the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus in mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019;9:315. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00315>
36. Lloren K.K.S., Lee T., Kwon J.J., Song M.S. Molecular markers for interspecies transmission of avian influenza viruses in mammalian hosts. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(12):2706. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18122706>
37. Wang J., Qi X., Lu C. Mutations in the C-terminal tail of NS1 protein facilitate the replication of classical swine H1N1 influenza A virus in mice. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2012;57(3):169–75. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0110-0>
38. Soubies S.M., Volmer C., Croville G., et al. Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence. *J. Virol.* 2010;84(13):6733–47. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02427-09>
39. Feng X., Wang Z., Shi J., et al. Glycine at position 622 in PB1 contributes to the virulence of H5N1 avian influenza virus in mice. *J. Virol.* 2015;90(4):1872–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02387-15>
40. Xiao C., Ma W., Sun N., et al. PB2-588V promotes the mammalian adaptation of H10N8, H7N9 and H9N2 avian influenza viruses. *Sci. Rep.* 2016;6:19474. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep19474>
41. Hu M., Yuan S., Zhang K., et al. PB2 substitutions V598T/I increase the virulence of H7N9 influenza A virus in mammals. *Virology*. 2017;501:92–101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.008>
42. Yamayoshi S., Kiso M., Yasuhara A., et al. Enhanced replication of highly pathogenic influenza A (H7N9) virus in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2018;24(4):746–50. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2404.171509>
43. Taft A.S., Ozawa M., Fitch A., et al. Identification of mammalian-adapting mutations in the polymerase complex of an avian H5N1 influenza virus. *Nat. Commun.* 2015;6:7491. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms8491>
44. Zhong G., Le M.Q., Lopes T.J.S., et al. Mutations in the PA protein of avian H5N1 influenza viruses affect polymerase activity and mouse virulence. *J. Virol.* 2018;92(4):e01557-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01557-17>
45. Liang L., Jiang L., Li J., et al. Low polymerase activity attributed to PA drives the acquisition of the PB2 E627K mutation of H7N9 avian influenza virus in mammals. *mBio*. 2019;10(3):e01162-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01162-19>
46. Zhu W., Zou X., Zhou J., et al. Residues 41 V and/or 210D in the NP protein enhance polymerase activities and potential replication of novel influenza (H7N9) viruses at low temperature. *Viral. J.* 2015;12:71. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0304-6>
47. Kanrai P., Mostafa A., Madhugiri R., et al. Identification of specific residues in avian influenza A virus NS1 that enhance viral replication and pathogenicity in mammalian systems. *J. Gen. Virol.* 2016;97(9):2135–48. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000542>
48. Li J., Zhang K., Chen Q., et al. Three amino acid substitutions in the NS1 protein change the virus replication of H5N1 influenza virus in human cells. *Virology*. 2018;519:64–73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.04.004>
49. Nao N., Kajihara M., Manzoor R., et al. A single amino acid in the M1 protein responsible for the different pathogenic potentials of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137989. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137989>
50. Jiao P., Tian G., Li Y., et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J. Virol.* 2008;82(3):1146–54. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01698-07>
51. Lipatov A.S., Andreansky S., Webby R.J., et al. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J. Gen. Virol.* 2005;86(Pt. 4):1121–30. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.80663-0>

52. Ayllon J., Domingues P., Rajsbaum R., et al. A single amino acid substitution in the novel H7N9 influenza A virus NS1 protein increases CPSF30 binding and virulence. *J. Virol.* 2014;88(20):12146–51.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01567-14>
53. Spesock A., Malur M., Hossain M.J., et al. The virulence of 1997 H5N1 influenza viruses in the mouse model is increased by correcting a defect in their NS1 proteins. *J. Virol.*

- 2011;85(14):7048–58.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00417-11>
54. Schmolke M., Manicassamy B., Pena L., et al. Differential contribution of PB1-F2 to the virulence of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mammalian and avian species. *PLoS Pathog.* 2011;7(8):e1002186.  
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002186>

#### Информация об авторах

**Зиняков Николай Геннадьевич** — канд. биол. наук, в. н. с. референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, [zinyakov@arriah.ru](mailto:zinyakov@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

**Грехнева Елена Дмитриевна**<sup>✉</sup> — аспирант, ведущий специалист референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, [grhneva@arriah.ru](mailto:grhneva@arriah.ru), <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202>

**Андрьясов Артём Валерьевич** — канд. биол. наук, в. н. с. референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, [andriyasov\\_av@arriah.ru](mailto:andriyasov_av@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6314-2119>

**Овчинникова Евгения Валерьевна** — канд. биол. наук, с. н. с. референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, [ovchinnikova@arriah.ru](mailto:ovchinnikova@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0001-5501-4432>

**Гусева Нелли Андреевна** — ведущий специалист референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, [guseva\\_na@arriah.ru](mailto:guseva_na@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0002-7623-4749>

**Козлов Антон Александрович** — канд. биол. наук, н. с. референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, [kozlov\\_aa@arriah.ru](mailto:kozlov_aa@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1466-7602>

**Никонова Зоя Борисовна** — канд. биол. наук, н. с. референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, [nikonova@arriah.ru](mailto:nikonova@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0003-0090-9399>

**Жестков Павел Дмитриевич** — ведущий специалист референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, [zhestkov@arriah.ru](mailto:zhestkov@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8204-280X>

**Андрейчук Дмитрий Борисович** — канд. биол. наук, зав. референтной лабораторией вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, [andreychuk@arriah.ru](mailto:andreychuk@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>

**Чвала Илья Александрович** — канд. вет. наук, зам. директора по научно-исследовательской работе Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, [chvala@arriah.ru](mailto:chvala@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>

**Участие авторов:** Зиняков Н.Г. — составление плана научной работы и проведение полногеномного секвенирования; Андрьясов А.В., Овчинникова Е.В., Гусева Н.А. — исследование биологического материала на наличие вируса гриппа птиц; Никонова З.Б., Жестков П.Д. — вирусыведение положительных проб; Грехнева А.Д., Козлов А.А. — подготовка нуклеиновой кислоты для полногеномного секвенирования; Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. — составление плана научной работы и организация отбора и доставки материала для исследования. Все авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 06.02.2025;  
принята к публикации 24.04.2025;  
опубликована 28.06.2025

#### Information about the authors

**Nikolay G. Zinyakov** — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, [zinyakov@arriah.ru](mailto:zinyakov@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

**Alena D. Grekhneva**<sup>✉</sup> — leading specialist, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, [grhneva@arriah.ru](mailto:grhneva@arriah.ru), <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202>

**Artem V. Andriyasov** — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, [andriyasov\\_av@arriah.ru](mailto:andriyasov_av@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6314-2119>

**Evgeniya V. Ovchinnikova** — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, [ovchinnikova@arriah.ru](mailto:ovchinnikova@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0001-5501-4432>

**Nelli A. Guseva** — leading specialist, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, [guseva\\_na@arriah.ru](mailto:guseva_na@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0002-7623-4749>

**Anton A. Kozlov** — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, [kozlov\\_aa@arriah.ru](mailto:kozlov_aa@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1466-7602>

**Zoya B. Nikonova** — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, [nikonova@arriah.ru](mailto:nikonova@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0003-0090-9399>

**Pavel D. Zhestkov** — leading specialist, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, [zhestkov@arriah.ru](mailto:zhestkov@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8204-280X>

**Dmitry B. Andreychuk** — Cand. Sci. (Biol.), Head, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, [andreychuk@arriah.ru](mailto:andreychuk@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>

**Ilya A. Chvala** — Cand. Sci. (Vet.), Deputy director for research, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, [chvala@arriah.ru](mailto:chvala@arriah.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>

**Author contribution:** Zinyakov N.G. — drawing up a plan for scientific work and conducting full-genome sequencing; Andriyasov A.V., Ovchinnikova E.V., Guseva N.A. — examination of biological material for the presence of avian influenza virus; Nikonova Z.B., Zhestkov P.D. — virus isolation of positive samples; Grekhneva A.D., Kozlov A.A. — preparation of nucleic acid for whole genome sequencing; Andreychuk D.B., Chvala I.A. — development of the plan of scientific work and organization of selection and delivery of material for the study. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 06.02.2025;  
accepted for publication 24.04.2025;  
published 28.06.2025