

Оригинальная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-395>

Потенциал адаптации к млекопитающим вирусам гриппа птиц H7N2 североамериканской линии

Ляшко А.В.¹, Руднева И.А.¹, Щербинин Д.Н.¹, Ломакина Н.Ф.^{1✉}, Трещалина А.А.²,
Куприянова И.М.¹, Гамбарян А.С.², Тимофеева Е.Б.¹, Шилов А.А.¹, Садыкова Г.К.¹,
Прилипов А.Г.¹, Тимофеев Б.И.¹, Шмаров М.М.^{1,3}, Рязанова Е.Л.³, Тимофеева Т.А.¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

²Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация

Введение. Вирусы гриппа птиц подтипа H7 вызывают тяжёлые эпизоотии среди птиц и филогенетически различаются в Восточном и Западном полушарии. Многочисленные случаи заражения людей этими вирусами в Восточном полушарии указывают на то, что вирусы H7 могут преодолевать межвидовой барьер и представляют потенциальную угрозу новой пандемии. Вирусы H7N2 с делецией аминокислот 221–228 (в нумерации H3) в гемагглютинине (HA) циркулировали среди домашней птицы в Западном полушарии в 1996–2006 гг. и вновь были обнаружены в 2016 г. в приюте для животных, где вызвали заболевание кошек.

Цель работы — выяснить механизм адаптации к млекопитающим вирусам гриппа североамериканской линии H7N2 с делецией в HA.

Материалы и методы. Вирус A/chicken/New Jersey/294598-12/2004 (H7N2) был адаптирован к мышам пассированием через лёгкие. Проведён анализ полных геномов исходного и адаптированного к мышам вариантов вируса. Определены специфичность вирусов к аналогам клеточных рецепторов, термостабильность HA, значение pH активации HA, вирулентность для мышей.

Результаты. Непатогенный птичий вирус гриппа H7N2 после 10 пассажей на мышах стал патогенным. В 5 вирусных белках произошли аминокислотные замены: по 1 в PB2 (E627K), NA (K127N), NP (E14Q), 4 в HA, 6 в NS1. Мутации в HA слабо повлияли на рецепторную специфичность, но способствовали возрастанию значения pH активации HA на 0,4 единицы. Наибольшим изменениям подвергся белок NS1 в позициях N73T, S114G, K118R, G171A, F214L и G224R, где в исходном варианте наблюдался полиморфизм, а в адаптированном варианте сохранились только минорные альтернативные аминокислоты.

Заключение. Из результатов следует, что вирусы H7N2 обладают потенциалом адаптации к млекопитающим. Возрастание вирулентности, скорее всего, обусловлено адаптационной мутацией E627K в PB2 и, возможно, мутациями в HA.

Ключевые слова: вирус гриппа подтипа H7N2, адаптация к млекопитающим, адаптационные мутации

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 Комитетом по этике Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи (протокол № 12 от 28.06.2021).

Благодарность. Авторы благодарят сотрудников лаборатории анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи О.Л. Воронину, Е.И. Аксенову, М.С. Кунда, Н.Н. Рыжову за полногеномное секвенирование вирусов на платформе «Illumina».

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

Для цитирования: Ляшко А.В., Руднева И.А., Щербинин Д.Н., Ломакина Н.Ф., Трещалина А.А., Куприянова И.М., Гамбарян А.С., Тимофеева Е.Б., Шилов А.А., Садыкова Г.К., Прилипов А.Г., Тимофеев Б.И., Шмаров М.М., Рязанова Е.Л., Тимофеева Т.А. Потенциал адаптации к млекопитающим вирусам гриппа птиц H7N2 североамериканской линии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):442–453. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-395>

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

The adaptive potential of North American subtype H7N2 avian influenza viruses to mammals

Aleksandr V. Lyashko¹, Irina A. Rudneva¹, Dmitrii N. Shcherbinin¹, Natalia F. Lomakina^{1✉}, Anastasia A. Treshchalina², Irina M. Kupriyanova¹, Alexandra S. Gambaryan², Elena B. Timofeeva¹, Aleksandr A. Shilov¹, Galina K. Sadykova¹, Alexey G. Prilipov¹, Boris I. Timofeev¹, Maxim M. Shmarov^{1,3}, Elena L. Ryazanova³, Tatiana A. Timofeeva¹

¹Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune and Biological Products, Moscow, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Introduction. H7 subtype avian influenza viruses causing severe epizootics among birds are phylogenetically different in the Eastern and Western hemispheres. Numerous human infections caused by these viruses in the Eastern hemisphere indicate that H7 viruses can overcome the interspecies barrier and pose a potential threat of a new pandemic. The H7N2 viruses with deletion of amino acids 221–228 (H3 numbering) in hemagglutinin (HA) had been circulating among poultry in the Western Hemisphere during 1996–2006, and had once again been detected in 2016 in an animal shelter, where they caused cat diseases.

The objective of this study is to elucidate the mechanism of adaptation to mammals of North American H7N2 influenza viruses with deletion in HA.

Materials and methods. The A/chicken/New Jersey/294598-12/2004 (H7N2) virus was adapted to mice by the lung passages. Complete genomes of original and mouse-adapted viruses were analyzed. The receptor specificity and thermostability of viruses, HA activation pH and virulence for mice were determined.

Results. The non-pathogenic H7N2 avian influenza virus became pathogenic after 10 passages in mice. Amino acid substitutions occurred in five viral proteins: one in PB2 (E627K), NA (K127N), NEP (E14Q), four in HA and six in NS1. Mutations in HA slightly changed receptor specificity but increased the pH of HA activation by 0.4 units. The NS1 protein undergone the greatest changes in the positions (N73T, S114G, K118R, G171A, F214L and G224R), where amino acid polymorphisms were observed in the original virus, but only minor amino acid variants have been preserved in the mouse adapted variant.

Conclusion. The results show that H7N2 viruses have the potential to adapt to mammals. The increase in virulence is most likely due to the adaptive E627K mutation in PB2 and possibly in HA.

Keywords: H7N2 influenza virus; adaptation to mammals; adaptive mutations

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 D.I. Ivanovsky Institute of Virology of the National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya (protocol No. 12, 28 June, 2021).

Acknowledgement. The authors thank the staff of the Genome Analysis Laboratory of the N.F. Gamaleya Federal State Budgetary Institution of the Russian Ministry of Health O.L. Voronina, E.I. Aksenova, M.S. Kunda and N.N. Ryzhova for the complete genome sequencing of viruses on the Illumina platform.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

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

For citation: Lyashko A.V., Rudneva I.A., Shcherbinin D.N., Lomakina N.F., Treshchalina A.A., Kupriyanova I.M., Gambaryan A.S., Timofeeva E.B., Shilov A.A., Sadykova G.K., Prilipov A.G., Timofeev B.I., Shmarov M.M., Ryazanova E.L., Timofeeva T.A. The adaptive potential of North American subtype H7N2 avian influenza viruses to mammals. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2023;100(6):442–453.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-395>

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

Введение

Вирусы гриппа А подтипа Н7 ассоциируются с тяжёлыми эпизоотиями птичьего гриппа среди домашней птицы, преимущественно отряда курообраз-

ных. По вирулентным свойствам вирусы гриппа Н7 подразделяются на низкопатогенные (апатогенные) и высокопатогенные [1]. Низкопатогенные вирусы бессимптомно циркулируют среди домашних и диких

птиц околоводного комплекса [2, 3]. Высокопатогенные вирусы главным образом выделяют от домашних птиц, у которых они вызывают заболевание с характерными признаками и летальным исходом [4]. В период эпизоотий в неблагополучных районах высокопатогенные вирусы H7 были также обнаружены у разных видов синантропных и диких птиц [5, 6].

Случаи заражения людей вирусом H7 были зафиксированы в XX в. у лиц, тесно контактировавших с больной птицей. В 2003 г. первые массовые заражения наблюдали у 82 работников птицефермы во время эпизоотии высокопатогенного гриппа H7N7 в Нидерландах. Инфекция проявлялась в виде конъюнктивита и/или гриппоподобного заболевания в лёгкой форме, в 1 случае болезнь привела к летальному исходу [7].

В 2013–2017 гг. 5 волн эпидемии гриппа H7N9 поразили Китай. Возбудителем эпидемий оказались как низко- так и высокопатогенные вирусы гриппа птиц. За весь период было зарегистрировано 1568 заболевших, из которых 616 скончались. Источником заражения людей стали рынки живой птицы и дворовые хозяйства домашней птицы, где низкопатогенные вирусы H7 бессимптомно присутствовали с 2013 г. [3, 6]. В 2016 г. на юге Китая (провинция Гуандун) появился высокопатогенный вирус H7, который резко отличался по свойствам и клиническим проявлениям от присутствовавших ранее и эволюционировал из предшественника одной из многочисленных линий низкопатогенного вируса H7, циркулировавших в Китае с 2013 г. [6, 8–10].

Заболевания людей в тяжёлой лёгочной форме со смертельным исходом вызвали озабоченность ВОЗ в связи с потенциальной угрозой возникновения нового пандемического вируса подтипа H7. Была разработана программа по противодействию возможной пандемии¹, что послужило стимулом для учёных разных стран к изучению особенностей вирусов гриппа птиц подтипа H7.

Филогенетически все вирусы подтипа H7 разделяют на вирусы Западного полушария, Восточного полушария и линию вирусов гриппа лошадей. Среди вирусов Восточного полушария обособленно выделяется Австралийская линия вирусов. Остальные изоляты принадлежат хорошо изученной Евразийской линии и образуют многочисленные ветви на эволюционном дереве, отражающие их географическое распределение [11]. Вирусы H7 Западного полушария по HA разделяют на три больших кластера и несколько клад [12]. Исследуемый в настоящей работе вирус принадлежит кладе П-2 северноамериканской линии.

Низкопатогенные вирусы H7 вызывают бессимптомную инфекцию у диких водоплавающих птиц. Их занос в популяцию домашних птиц долгое время может оставаться незамеченным, если вирус не вызывает клинических проявлений [2, 4, 10]. Циркуляция среди домашних птиц (отряд курообразных) способствует накоплению мутаций, которые приводят к изменению вирулентности и формированию высокопатогенных вирусов [4, 8, 10, 13].

За 1959–2019 гг. в разных частях мира наблюдали 27 независимых событий происхождения высокопатогенных вирусов гриппа H7 из низкопатогенного предшественника [13].

Ведущую роль в эволюции и изменении патогенности вирусов гриппа H7 играет поверхностный белок гемагглютинин (HA), в котором находятся главные антигенные детерминанты вируса. На стадии проникновения вируса в клетку HA обеспечивает связь с клеточными рецепторами [14] и опосредует слияние вирусной и клеточной мембран [15]. Детерминантой патогенности вирусов H7 является структура сайта протеолитического расщепления предшественника HA: в апатогенных штаммах присутствует один аминокислотный остаток аргинина (R), в высокопатогенных — вставка из нескольких аминокислот с основными свойствами [1, 13].

Специфичность вирусов гриппа относительно круга хозяев определяется их способностью распознавать рецепторы, характерные для определённого вида хозяина. Рецепторы птиц представляют собой сиалогликозиды с типом связи alpha2-3, а рецепторы человека (возможно, и других млекопитающих) — сиалогликозиды с типом связи alpha2-6. Структуру рецептор-связывающего кармана HA всех вирусов гриппа формируют три составляющих элемента (в нумерации H3): петля-130 (а.к. 134–138), петля-190 (а.к. 188–194) и петля-220 (а.к. 221–228). Мутации в этих участках HA приводят к адаптации вирусов к человеку и формированию пандемических штаммов подтипов H1N1 (*E190D/G225D*) и H2N2/H3N2 (*Q226L* и *G228S*) [14, 16].

Для межвидовой смены хозяина вирусы гриппа должны обладать способностью распознавать рецепторы нового хозяина и приспособиться к использованию клеточных факторов хозяина, которые необходимы вирусу для успешной репродукции. Мутации, способствующие адаптации к новому хозяину, в первую очередь затрагивают поверхностные белки HA и нейраминидазу (NA), белки полимеразного комплекса, а также неструктурный белок NS1. Белок NS1 ингибирует передачу сигналов противовирусной защиты хозяина и подавляет экспрессию его белков. Множественные функции NS1 осуществляет благодаря взаимодействию с белками, РНК и другими факторами хозяйской клетки, которые отличаются у разных хозяев. Отличия в первичной структуре NS1 специализированных ви-

¹ The PIP Framework's Partnership Contribution (PC) High-Level Implementation Plan II 2018–2023 (HLIP-II).
URL: <https://www.who.int/publications/i/item/pip-pc-preparedness-high-level-implementation-plan-ii-2018-2023>

русов разной хозяйской принадлежности отражают высокую пластичность этого белка, которому отводится важная роль в преодолении межвидового барьера и адаптации вируса к новому хозяину [17, 18]. Адаптированный к новым условиям вирус должен не только размножаться в новом организме, но и передаваться от одного индивидуума другому, т.е. обладать достаточно высокой контагиозностью. До сих пор не зафиксированы доказанные случаи передачи вирусов H7Nx от человека к человеку², заражение происходило при тесном контакте с источником инфекции — в основном с больной птицей.

В 1996 г. на рынках живой птицы на северо-востоке США были обнаружены низкопатогенные вирусы H7 с делецией из 8 аминокислот (п. 221–228 в нумерации по H3) в HA — у них отсутствовала петля-220 в области рецепторсвязывающего сайта [2]. Североамериканская линия вирусов с делецией (клада II-2) циркулировала на северо-востоке США с 1996 по 2006 г. среди домашней птицы [12]. Вирусы имели сайт расщепления HA слабовирулентного фенотипа [2] и обладали двойственной специфичностью взаимодействия с рецепторами, т.е. наряду с высокой аффинностью к рецепторам «птичьего» типа (α 2-3) они проявляли умеренное связывание с рецепторами, характерными для человека (α 2-6) [11, 16, 19]. Существенную роль в сохранении третичной структуры HA и обеспечении двойственной рецепторной специфичности играют два аргинина — R220 и R229, оказавшиеся рядом из-за делеции п. 221–228 (в нумерации H3), как показало исследование вируса A/New York/107/2004 (H7N2) североамериканской линии (клада II-2), изолированного от человека [16].

Способность вирусов H7N2 распознавать рецепторы человеческого типа указывает на повышенный потенциал преодоления межвидового барьера и адаптацию к человеку или другим видам млекопитающих.

За время циркуляции вирусов подтипа H7N2 (1994–2006 гг.) на северо-востоке США были зафиксированы 2 лабораторно подтверждённых случая инфицирования людей этими вирусами. Позднее, с декабря 2016 г. по февраль 2017 г., в приютах для животных в Нью-Йорке наблюдали вспышку респираторной инфекции среди домашних кошек. Причиной заболевания около 500 кошек оказался низкопатогенный вирус гриппа H7N2 с делецией в HA. У ветеринара, тесно контактировавшего с больной кошкой, наблюдалась гриппоподобная инфекция. Секвенирование 6 изолятов от кошек и 1 изолята от человека показало, что все 8 сегментов кошачьих вирусов филогенетически были близки

низкопатогенным вирусам кур, циркулировавшим в Нью-Йорке в конце 1990-х и начале 2000-х гг. Вирусы от кошек и человека были почти идентичны, и у них отсутствовали адаптационные мутации для млекопитающих [20, 21].

Возможность преодоления межвидового барьера вирусами H7N2 с делецией петли-220 в HA побудила нас к исследованию механизма адаптации этих вирусов к млекопитающим на примере одного из представителей этой линии — вируса A/chicken/New Jersey/294598-12/2004.

Цель работы — выяснить механизм адаптации к млекопитающим вирусов гриппа североамериканской линии H7N2 с делецией в HA.

Материалы и методы

Вирус A/chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) (GenBank EU743253-EU743260), который поддерживался в куриных эмбрионах (КЭ), был любезно предоставлен доктором А.И. Климовым, CDC USA (CDC-2004708596). В результате клонирования вируса методом предельных разведений в КЭ был получен вариант A/chicken/New Jersey/294598-12/2004 (ch/NJ), который использовали в настоящей работе в качестве исходного вируса.

Адаптация вируса к размножению в лёгких белых беспородных мышей проведена, как описано ранее [25]. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Исследования на животных одобрены Комитетом по этике Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи (протокол № 12 от 28.06.2021).

Реакция гемагглютинации (РГА) проводилась по общепринятой методике [1]. 50% эмбриональную инфекционную дозу (ЭИД₅₀/мл) вирусов гриппа определяли, как описано в работе [25], каждым разведением вируса заражали 5 КЭ. Среднее значение ЭИД₅₀/мл для каждого вируса вычисляли методом L.J. Reed и H. Muench [22].

Определение 50% летальной дозы (ЛД₅₀) вируса гриппа проводили на мышах линии BALB/c согласно [25], для каждого разведения вируса использовали по 6 мышей в группе. Значение ЛД₅₀/мл вычисляли по методу Кербера в редакции Ашмарина [23].

Секвенирование на платформе «MiSeq» («Illumina») выполнено сотрудниками лаборатории анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи О.Л. Ворониной, Е.И. Аксеновой, М.С. Кунда, Н.Н. Рыжовой (GenBank, MN400380-MN400395). Библиотеки готовили согласно [24], секвенирование выполняли на платформе «MiSeq» («Illumina») с использованием картриджа 600-cycle «MiSeq Reagent Kit v3».

² Avian influenza A (H7N9) virus outbreak.
URL: [https://www.who.int/emergencies/situations/avian-influenza-a-\(h7n9\)-virus-outbreak](https://www.who.int/emergencies/situations/avian-influenza-a-(h7n9)-virus-outbreak)

Таблица 1. Фенотипические свойства исходного вируса A/chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2) (ch/NJ) и его адаптированного к мышам варианта (MA/NJ)**Table 1.** Phenotypic properties of the original (ch/NJ) and mouse-adapted (MA/NJ) variants of the virus A/chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2)

Вирус Virus	Вирулентность* Virulence*	Термо- стабильность, °C Thermostability, °C	Значение pH активации HA# HA activation pH values#	Сродство к аналогам рецепторов, K_{diss} , nM SA** Affinity for cell receptor analogues, K_{diss} , nM SA**		
				Fet-HRP	3'SLN	6'SLN#
ch/NJ	> 9,6 авирулентный avirulent	62,3 ± 0,2	5,2 ± 0,1	200 ± 100	100 ± 50	200 ± 50
MA/NJ	4,0 ± 0,2	62,3 ± 0,2	5,6 ± 0,1	200 ± 100	100 ± 50	500 ± 50

Примечание. Для каждого метода исследования приведены средние значения 3 независимых экспериментов.

*Вирулентность представлена как \lg ЭИД₅₀ в единице ЛД₅₀.

**Результаты титрования с фетуиновым конъюгатом (Fet-HRP) и биотинилированными полимерами 3'SLN и 6'SLN представлены в виде константы диссоциации, выраженной в наномолях сиаловой кислоты. Более высокое значение соответствует меньшему сродству к рецепторным аналогам.

$p \leq 0,05$ по критерию Стьюдента.

Note. The average values of three independent experiments are presented.

* Virulence for mice is represented as \log_{10} of EID₅₀ in one unit of LD₅₀. A lower value corresponds to a higher pathogenicity.

** The results of titration with peroxidase-labeled fetuin conjugate (Fet-HRP) and biotinylated polymers 3'SLN (Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ) and 6'SLN (6'SLN — Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ) are presented as a dissociation constant expressed in nanomoles of sialic acid. A higher value corresponds to a lower affinity for cellular receptor analogues.

#Significant differences according to the Student's criterion ($p \leq 0.05$).

Сборку геномов *de novo* и по референсу A/chicken/NJ/294508-12/2004(H7N2) (EU743253-EU743260, GenBank) проводили в программе «CLC Genomics Workbench 10.0».

Секвенирование методом Сэнгера проведено, как описано ранее [25]. Для структурно-функционального анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали биоинформационные ресурсы The National Center for Biotechnology Information³ и Influenza Research Database⁴ (IRD).

Термостабильность HA вирусов гриппа определяли, как описано ранее [25]. Температурой инактивации считалась та, при которой после 40 мин инкубации вируса титр в РГА снижался на 6 \log_2 .

Значение pH активации HA определяли методом гемолиза эритроцитов [25], который основан на способности HA агглютинировать эритроциты при нейтральных значениях pH и вызывать их гемолиз при низких значениях вследствие конформационного изменения HA.

Сродство вирусов к аналогам клеточных рецепторов определяли по взаимодействию с сиалоолигосахаридами, конъюгированными с высокомолекулярным полиакриламидом, меченным биотином [14]. Использовали сиалоолигосахариды Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ (3'SLN) и Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ (6'SLN). Результаты выражали в виде константы диссоциации, рассчитанной по сиаловой кислоте (K_{diss} , nM SA).

Статистическая обработка данных выполнена с применением параметрического t-теста Стьюдента (pH активации и термостабильность HA), не-

параметрического критерия Фридмана (ANOVA) и Манна–Уитни (титр вирусов) при критическом уровне значимости $p \leq 0,05$. Для проведения соответствующих расчётов использовали программы «MS Office Excel 2016» и «Statistica 8.0». Полученные результаты представлены как среднеарифметическое (pH активации и термостабильность HA) или среднегеометрическое (титр вирусов) значение со стандартным отклонением.

Результаты

Адаптация к мышам

Адаптацию вируса гриппа птиц A/chicken/NJ/294598-12/2004 (ch/NJ) к размножению в лёгких мышей проводили последовательными пассажами через лёгкие. После 10 пассажей получили вариант, который вызывал гибель мышей с обширными геморрагическими поражениями лёгких. Полученный вариант был однократно клонирован методом предельных разведений в КЭ для получения однородной вирусной популяции, назван A/chicken/NJ/294598-12MA/2004 (MA/NJ) и депонирован в Государственную коллекцию вирусов (подразделение Института вирусологии им. Д.И. Иванковского НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) под номером 2890.

Фенотипические свойства вирусов

Исходный клонированный вариант ch/NJ напливался в КЭ в титре 9,6 \lg ЭИД₅₀, близкий титр накопления (9,7 \lg ЭИД₅₀) был у адаптированного к мышам варианта MA/NJ.

Исходный ch/NJ и адаптированный к мышам MA/NJ-вариант были исследованы на патогенность для мышей, рецепторную специфичность, термо-

³ URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁴ URL: <https://www.bv-brc.org>

стабильность вируса и значение рН активации НА (табл. 1).

Исходный вирус обладал авирулентным фенотипом для мышей: мыши оставались живы после интраназального инфицирования предельно высокими дозами вируса (8,6 и 9,6 Ig ЭИД₅₀ на мышь). Напротив, адаптированный вариант MA/NJ в меньших дозах (4,7 Ig ЭИД₅₀ на мышь) вызывал гибель 100% животных с характерными изменениями в лёгких.

Возрастание вирулентности MA/NJ сопровождалось увеличением значения рН активации НА на 0,4 ед. по сравнению с исходным вирусом ch/NJ (табл. 1).

При определении рецепторной специфичности оба варианта вируса связывались с фетуином, что характерно для всех вирусов гриппа. Сродство к аналогу рецепторов птиц 3'SLN у них было немного выше, чем к аналогу человеческих рецепторов 6'SLN; у адаптированного варианта MA/NJ сродство к человеческому рецептору понизилось в большей степени, чем у исходного вируса ch/NJ.

Секвенирование

При секвенировании на платформе «Illumina» для некоторых позиций в сегментах 4 и 8 получены неоднозначные результаты, поэтому было проведено дополнительное секвенирование методом Сэнгера. Результаты секвенирования разными методами совпали (табл. 2). Установлено, что исходный вирус ch/NJ представлял собой гетерогенную популяцию с полиморфизмом в сегментах 4 и 8. Последовательные пассажи в лёгких мышей позволили получить гомогенную популяцию вируса с закреплением аминокислот, которые в исходном вирусе присутствовали в качестве минорных. Исключение составила п. 125/133 в НА, где наблюдали гетерогенность (F < L) в MA/NJ-варианте, отсутствующую в исходном вирусе. В адаптанте MA/NJ были обнаружены аминокислотные замены в 5 белках: по 1 в PB2, NA, NEP, 4 в НА, 6 в NS1.

Обсуждение

Анализ аминокислотных замен в вирусных белках

В белке **PB2** полимеразы замена E627K считается адаптационной к млекопитающим. Она повышает полимеразную активность вирусной полимеразы и увеличивает патогенность вируса для млекопитающих [26–28]. Можно предположить, что возрастание вирулентности для мышей варианта MA/NJ обусловлено именно этой мутацией.

Нейраминидаза обоих вариантов имеет делецию 16 аминокислот (п. 56–71)⁵ в стеблевой ча-

Таблица 2. Аминокислотные различия в исходном (ch/NJ) и адаптированном к мышам (MA/NJ) вариантах вируса A/chicken/New Jersey/294598-12C/2004 (H7N2)

Table 2. Amino acid differences in the original (ch/NJ) and mouse-adapted (MA/NJ) variants of the A/chicken/New Jersey/294598-12/2004 (H7N2) virus

Белок Protein	Позиция аминокислоты Amino acid position	ch/NJ ²	MA/NJ
PB2	627	E	K
HA ¹	125/133	F	L > F
HA	156/164	D > N	N
HA	198/207	G	E
HA	328/330	K	T
NA	127	K	N
NS1	73	N > T	T
NS1	114	S > G	G
NS1	118	K > R	R
NS1	171	G > A	A
NS1	214	F > L	L
NS1	224	R = G	R
NEP	14	E > Q	Q

Примечание. ¹Нумерация НА соответствует H3/H7. Приведена нумерация по зрелому белку HA/H3 штамма A/Aichi/2/68, для HA/H7 — по последовательности ACF25499 (GenBank).

²Преобладающая аминокислота выделена жирным шрифтом.

Note. ¹The numbering of HA corresponds to H3/H7. Numbering is given for the mature HA/H3 protein of strain A/Aichi/2/68, and for HA/H7 according to the sequence ACF25499 (GenBank).

²The ratio of alternative amino acids. The predominant amino acid is in bold font.

сти молекулы. Замена K127N (143) (нумерация по QEL43992, GenBank) в NA подтипа N2 находится в головной части молекулы, выступающей на поверхности вириона, входит в состав экспериментально установленных эпитопов и отличается полиморфизмом (по данным IRD). Аминокислота 127K (143K) контактирует с аминокислотой 450F (466F) соседней цепи гомотетрамера NA. Замена аминокислоты 127K с протяжённой боковой цепью на 127N с короткой боковой цепью теоретически может повлиять на контакт соседних цепей. Для североамериканских вирусов H7N2 эта замена уникальная. Однако 127N в разные годы присутствовала в 146 природных изолятах исключительно вирусов птиц (преимущественно кур) других подтипов — H9N2 и H6N2 в Китае, непатогенных вирусах H5N2 в США и Мексике.

В **НА**, принадлежащем кладе II-2 североамериканской линии вирусов с делецией, в результате адаптации к мышам произошли 4 замены: F125/133L, D156/164N, G198/207E, K328/330T (табл. 2, табл. 3), которые слабо повлияли на рецепторную специфичность адаптанта MA/NJ (табл. 1) и не изменили термостабильность НА.

В MA/NJ наблюдается мутация K328/330T, расположенная в сайте расщепления НА в пози-

⁵ В данном подразделе в круглых скобках приведена нумерация по NA референтного штамма A/Tokyo/3/1967(H2N2), AAO46245, GenBank; PDB: 1INH.

Таблица 3. Мутации в HA/H7 в адаптированном к мышам вирусе и альтернативные аминокислоты в данной позиции в природных изолятах, выделенных в Северной Америке в 1996–2022 гг.

Table 3. Mutations in HA/H7 of a mouse-adapted virus and alternative amino acids in these positions in natural isolates isolated in North America in 1996–2022

Позиция H3/H7 Position H3/H7	Аминокислота, вариант вируса Amino acid, virus variant		Количество вирусов H7 с указанной аминокислотой The number of H7 viruses with the indicated amino acid		Функциональный домен Functional domain	Источник Reference	
	ch/NJ	MA/NJ	вирусы всех хозяев viruses of different hosts, <i>n</i> = 1107				
			HA с делецией петли-220 HA with 220 loop deletion, <i>n</i> = 230*				
125/133	F	F/L	L = 3, F = 1104		F = 230	Антигенный сайт Antigenic site	[9]
156/164	N/D	N	N = 1094, D = 4, K = 1, S = 8		N = 227, S = 3	Антигенный сайт Antigenic site	[9]
198/207	G	E	E = 5, G = 1102		E = 1, G = 229	Антигенный сайт Antigenic site	[9]
328/330	K	T	A = 8, K = 47, P = 211, T = 824		K = 46, P = 184	Сайт расщепления Cleavage site	[2]

Примечание. *В выборку не вошли штаммы, полученные в результате лабораторных манипуляций, например эскейп-мутанты.
Note. *The sampling did not include laboratory obtained strains, for example, escape mutants.

ции –2. Структура сайта расщепления вирусов ch/NJ и MA/NJ — ЕКРКК↓G и ЕКРКТ↓G — соответствует апатогенному фенотипу. По данным IRD, обе структуры встречаются у вирусов H7 разных видов птиц на североамериканском континенте.

В базе данных IRD имеются 1107 полных последовательностей HA вирусов подтипа H7, выделенных в Северной Америке в 1996–2022 гг., среди них 230, которые имеют делецию петли 220 в HA (табл. 3). Вирусы с делецией петли-220 представлены изолятами 1996–2006 и 2016 гг. Вирусы были выделены из окружающей среды, от кур, некоторых видов домашней птицы, дикой утки, 2 штамма изолированы от людей — один в 2003 г., а другой в 2016 г., когда были выделены 6 штаммов от кошек. Мы проанализировали вариабельность аминокислот в позициях, в которых в MA/NJ-вирусе были обнаружены замены. Из табл. 3 следует, что в адаптированном к мышам варианте заслуживают внимания только 2 замены — полиморфизм F/L с преобладанием L в позициях F125/133L и G198/207E, поскольку две другие позиции (156/164 и 328/330) представляют одну из альтернативных аминокислот, присутствующих в природных изолятах.

В исходном вирусе в позиции 125/133 находится F, как и в природных вирусах H7. В MA/NJ наблюдается полиморфизм F/L с преобладанием L. Присутствие L в этой позиции — очень редкое явление. Среди природных вирусов H7 с такой заменой обнаружены 13 изолятов в разных частях мира, среди которых только 2 — в США (A/chicken/New York/Sg-00307/1998, H7N2 и A/American green-winged teal/Illinois/10OS4014/2010, H7N3). Такая редкая встречаемость свидетельствует о низкой конкурентной приспособленности HA с такой мутацией среди вирусов гриппа птиц.

Анализ вирусов H7N2 североамериканской линии, выделенных в 1999–2006 гг., указывает на то, что все эти вирусы имеют N в позиции 156/164. Наблюдаемый полиморфизм в исходном варианте ch/NJ с преобладанием в этой позиции D, скорее всего, частный случай.

Мутация D156/164N в адаптированном к мышам вирусе заменяет отрицательно заряженную аминокислоту на нейтральную. Замена G198/207E со сдвигом заряда в отрицательную сторону также относится к разряду редких среди исследованной группы вирусов. Не исключено, что две мутации со сменой заряда в позициях D156/164N и G198/207E, расположенных на поверхности HA, могут повлиять на его конформацию в зависимости от pH среды.

Изменения в белках NS1 и NEP

В процессе адаптации вируса кур ch/NJ к организму млекопитающих наибольшим изменениям подвергся сегмент 8, в котором изначально наблюдался полиморфизм 9 позиций нуклеотидной последовательности. В адаптированном варианте закрепились нуклеотиды, присутствовавшие в исходном варианте в меньшей доле. Из них 6 нуклеотидов привели к замене 6 аминокислот в белке NS1 и 1 замене в NEP (табл. 2, табл. 4).

Следует заметить, что в природных вирусах ген NS представлен двумя аллелями: аллель A присутствует у всех вирусов гриппа млекопитающих и некоторых вирусов гриппа птиц, а аллель B характерен исключительно для вирусов гриппа птиц [29]. Исследуемый нами вирус A/chicken/New Jersey/294598-12/2004(H7N2) обладает аллелем B. Возможно, этим объясняется высокая изменчивость гена NS адаптированного к мышам варианта MA/NJ.

Линия североамериканских вирусов подтипа H7 с делецией петли-220 в HA, к которой принад-

Таблица 4. Замены в NS1 в адаптированном к мышам варианте MA/NJ и их варибельность среди североамериканских вирусов гриппа птиц H7

Table 4. NS1 substitutions in the mouse-adapted MA/NJ variant, and their variability among North American avian H7 viruses

Замена ¹ Mutation ¹	Варианты аминокислот в выборке вирусов Amino acid variability		Домен Domain	Локализация Location	Функция ² Function ²
	H7N2, 1994–2007 (n = 263)	H7Nx, 1994–2022 (n = 908)			
<i>N73T</i>	N = 47, S = 7, T = 138	A = 1, N = 23, F = 1, P = 1, S = 656, T = 226	Домен взаимодей- ствия с РНК RNA binding domain	1–73	Взаимодействие с РНК, включая двухцепочеч- ные; с клеточными белками RIG-I, PABPI и импортином-альфа Binding with several RNA species, including dsRNA. Interactions with host proteins RIG-I, PABPI, and importin-alpha
<i>S114G</i>	G = 44, P = 1, S = 123	G = 133, P = 1, S = 774	Эффекторный домен Effector domain	87–203	Опосредованное взаимодействие с рядом клеточных белков хозяина; ядерно-цитоплаз- матический транспорт зрелых мРНК. Стабилизирует N-концевой домен (1–73) взаимодействия с РНК Mediated interaction with several host cellular proteins; nuclear-cytoplasmic transport of mature mRNAs; stabilization of the N-terminal domain (1–73) due to RNA interaction
<i>K118R</i>	R = 7, K = 161	R = 658, K = 250			
<i>G171A</i>	A = 60, R = 5, D = 7, G = 85, T = 11	A = 61, R = 5, N = 2, D = 648, G = 92, T = 100			
<i>F214L</i>	I = 1, L = 75, F = 91, X = 1	I = 1, L = 790, F = 116, X = 1	C-концевой домен C-terminal domain	204–230	Содержит сигнальные мотивы для фосфо- рирования CDK/ERK, связывания Crk/CrkL SH3, PDZ-лиганда, NoLS/NLS2 Contains signaling motifs for phosphorylation (CDK/ERK), Crk/CrkL SH3 binding, PDZ ligand and NoLS/NLS2
<i>G224R</i>	R = 77, G = 90	R = 807, G = 94, K = 5, S = 1			

Примечание. ¹Мутация в адаптированном к мышам варианте (исходный/адаптированный вариант).

²На основе данных работ [17, 18].

Note. ¹Mutation in the mouse-adapted variant (original/adapted variant). ²Based on data from [17, 18].

лежат исследуемый нами вирус ch/NJ, представле- на вирусами гриппа, изолированными от домашней птицы. Среди них, по данным GenBank, находится только один вирус, изолированный от человека, — A/New York/107/2003(H7N2), который, по сути, является вирусом «птичьего» происхождения. Сравнение последовательностей белков HA и NS1 этого вируса с исследованными нами вариантами ch/NJ и MA/NJ не обнаружило совпадающих мутаций в HA, в то время как в NS1 присутствуют три мутации — *N73T*, *G171A*, *F214L*, идентичные адаптированному к мышам варианту.

Мы провели анализ варибельности белка NS1 среди вирусов гриппа H7 всех подтипов по NA (H7Nx), которые присутствовали среди птиц в Северной Америке в 1994–2022 гг., а также для вирусов подтипа H7N2 за 1994–2007 гг., включающие годы циркулирования линии вирусов с делецией в HA и их предшественников (табл. 4; **рисунок**, см. приложение в дополнительных файлах к статье на сайте журнала: DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-395-1>).

В позициях 73, 114, 118, 171, 214 и 224, где произошли замены в варианте MA/NJ, между этими выборками нет существенных различий по набору варьирующих аминокислот, различается только процентное соотношение конкретных аминокислот (**рисунок**, см. приложение на сайте журнала). На-

блюдаемое различие в распределении аминокислот в NS1 между двумя выборками вирусов гриппа птиц подтипа H7, отличающихся подтипом NA, может свидетельствовать об обособленности вирусов H7N2, циркулировавших в 1994–2007 гг., и существованием у них некоторой взаимосвязи (сцепленности) между сегментами 4, 6 и 8, кодирующими белки HA, NA и NS.

Во всех позициях NS1, которые подверглись заменам в варианте MA/NJ, наблюдается полиморфизм (табл. 4). Как в исходном ch/NJ, так и в MA/NJ-варианте в этих позициях присутствует одна из альтернативных аминокислот. Обнаруженные замены, по данным IRD, входят в состав экспериментально установленных коротких линейных эпитопов и в то же время находятся в структурно-функциональных доменах, которые осуществляют множественные контакты с факторами организма хозяина [17, 18].

В белке NEP в адаптированном к мышам варианте произошла одна замена *E14Q*, расположенная в сигнальной области NES (позиции 12–21, nuclear export signal), которая связывается с клеточным транспортным белком CRM1 и при его участии обеспечивает выход из ядра вирусных нуклеопротеиновых комплексов [30]. Сигнальная последовательность NES имеет гидрофобный характер (участок, богатый лейцинами или метионинами),

в котором замена 14M существенно не нарушает структуру сигнальной области. Тем не менее в вирусе WSN замена аминокислоты в этой позиции *M14Y* приводила к задержке экспорта вирусных рибонуклеинопротеиновых комплексов (vRNP) из ядра, снижению ростовых свойств вируса и его аттенуации для мышей [30]. Структура NES в исследованных нами вирусах отличается всего одной позицией от вируса WSN: *M14E* — в исходном вирусе ch/NJ, *M14Q* — в MA/NJ. В нашем случае замена аминокислоты со сменой заряда (*E14Q*) — кислая на нейтральную полярную гидрофильную — гипотетически может оказать влияние на функционирование сигнала NES.

Адаптационный потенциал

Известно всего 8 выделенных от млекопитающих вирусов гриппа H7N2 клады II-2, для которых была определена структура полного генома: это 2 изолята от людей (A/NY/107/2003 и A/NY/108/2016) и 6 — от кошек [20, 21, 31]. Геном вируса A/NY/108/2016, выделенного от человека в 2016 г., почти полностью совпал с геномом вируса, выделенного от кошки, с которой контактировал заболевший [20]. Мы сравнили белки HA и NS этих вирусов, а также вируса MA/NJ с их близкородственным вирусом кур A/chicken/NJ/294508-12/2004 с целью найти общие отличия в изолятах от млекопитающих. В HA между MA/NJ и вирусами млекопитающих нет совпадающих замен относительно куриного вируса. Для белка HA сходство (дивергенция) с куриным вирусом для MA/NJ составило 99,5% (0,5%), для вируса человека A/NY/107/2003 — 96,6% (3,5%), для вирусов кошек и человека A/NY/108/2016 — 94% (6,2%).

Для белка NS1 сходство (дивергенция) с куриным вирусом для MA/NJ составило 97,4% (2,7%), для вируса человека NY/107/2003 — 97,8% (2,2%), для 5 вирусов кошек (WDL) одного приюта — 92,6% (7,3%), для вируса кошки A/feline/New York/16-040082-1/2016 и контактирующего с ней человека (A/NY/108/2016) — 92,2% (7,8%). В NS1 среди замен относительно куриного вируса ch/NJ 5 (*N73T*, *S114G*, *G171A*, *F214L* и *G224R*) совпали у адаптированных к мышам MA/NJ и кошачьих вирусов, из которых 3 (*N73T*, *G171A*, *F214L*) идентичны заменам в вирусе от человека A/New York/107/2003(H7N2).

В NEP присутствует только одна совпадающая замена *E14Q*. В кошачьих вирусах, кроме неё, имеются ещё 4 отличия от куриного вируса.

Что касается идентичных мутаций в вирусах H7N2 млекопитающих (в NS1 — *N73T*, *G171A*, *F214L*, в NEP — *E14Q*), то замена произошла на преобладающую или менее распространённую аминокислоту из числа альтернативных, присутствующих в природных «птичьих» изолятах. Это не позволяет

признать их адаптационными без дополнительных исследований.

Примечательно, что в вирусах H7N2, изолированных от людей и кошек, отсутствовала мутация *E627K* в PB2 [20, 21], которую считают адаптационной к млекопитающим [26–28]. По данным разных авторов, появление мутации *E627K* при адаптации вирусов гриппа птиц к мышам сопровождалось усилением вирулентности вируса [27, 28], как и в нашем случае с MA/NJ. Помимо мутации в PB2, на изменение вирулентности MA/NJ могли повлиять замены в HA, которые способствовали возрастанию значения pH активации HA [10, 25].

Заключение

Проведённые нами исследования по адаптации к мышам низкопатогенного вируса гриппа кур H7N2, а также сведения о том, что вирусы этой линии смогли преодолеть видовой барьер и вызвать вспышку респираторной инфекции у кошек спустя 10 лет с момента их последнего обнаружения в природных условиях [20, 21], свидетельствуют о наличии адаптационного потенциала к млекопитающим у вирусов H7N2 североамериканской линии с делецией петли-220 в HA. Адаптация этих вирусов к разным видам млекопитающих, по-видимому, имеет свои особенности, и требуется некоторое время циркуляции в новом хозяине, чтобы вирус приобрёл мутации, способные вызвать клиническое проявление инфекции. Поскольку источник инфицирования кошек не установлен, то остаётся открытым вопрос, как вирусам H7N2 удавалось оставаться незамеченными и не попасть в поле зрения ветеринарных служб на протяжении более 10 лет.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. World Organization for Animal Health (WOAH). Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). Chapter 3.3.4. In: *OIE Terrestrial Manual*. Paris;2021.
2. Suarez D.L., Garcia M., Latimer J., et al. Phylogenetic analysis of H7 avian influenza viruses isolated from the live bird markets of the Northeast United States. *J. Virol.* 1999;73(5):3567–73. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.3567-3573.1999>
3. Shi J., Deng G., Ma S., et al. Rapid evolution of H7N9 highly pathogenic viruses that emerged in China in 2017. *Cell Host Microbe.* 2018;24(4):558–68.e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.006>
4. Capua I., Cattoli G., Terregino C., Marangon S. Avian influenza in Italy 1997–2006. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., Stech J., eds. *Avian Influenza. Monographs in Virology. Volume 27*. Basel;2008:59–70. DOI: <https://doi.org/10.1159/000151608>
5. Yao Y., Zhang T., Yang W., et al. Avian influenza A (H7N9) virus in a wild land bird in central China, late 2015. *Virol Sin.* 2018;33(1):96–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0001-x>
6. Li C., Chen H. H7N9 influenza virus in China. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2021;11(8):a038349. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038349>

7. Fouchier R.A., Schneeberger P.M., Rozendaal F.W., et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004;101(5):1356–61. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0308352100>
8. Lu J., Raghvani J., Pryce R., et al. Molecular evolution, diversity, and adaptation of influenza A(H7N9) viruses in China. *Emerg. Infect. Dis*. 2018;24(10):1795–805. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2410.171063>
9. Yang H., Carney P.J., Chang J.C., et al. Structural and molecular characterization of the hemagglutinin from the fifth-epidemic-wave A(H7N9) influenza viruses. *J. Virol*. 2018; 92(16):e00375-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00375-18>
10. Shi J., Deng G., Kong H., et al. H7N9 virulent mutants detected in chickens in China pose an increased threat to humans. *Cell Res*. 2017;27(12):1409–21. DOI: <https://doi.org/10.1038/cr.2017.129>
11. Gambaryan A.S., Matrosovich T.Y., Philipp J., et al. Receptor-binding Profiles of H7 subtype influenza viruses in different host species. *J. Virol*. 2012;86(8):4370–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.06959-11>
12. Xu Y., Bailey E., Spackman E., et al. Limited antigenic diversity in contemporary H7 avian-origin influenza A viruses from North America. *Sci. Rep*. 2016;6:20688. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep20688>
13. Lee D.H., Criado M.F., Swayne D.E. Pathobiological origins and evolutionary history of highly pathogenic avian influenza viruses. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2020;11(2):a038679. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038679>
14. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol*. 2000;74(18):8502–12. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8502-8512.2000>
15. Hamilton B.S., Whittaker G.R., Daniel S. Influenza virus-mediated membrane fusion: determinants of hemagglutinin fusogenic activity and experimental approaches for assessing virus fusion. *Viruses*. 2012;4(7):1144–68. DOI: <https://doi.org/10.3390/v4071144>
16. Yang H., Chen L.M., Carney P.J., et al. Structures of receptor complexes of a North American H7N2 influenza hemagglutinin with a loop deletion in the receptor binding site. *PLoS Pathog*. 2010;6(9):e1001081. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001081>
17. Васин А.В., Петрова-Бродская А.В., Плотникова М.А. и др. Эволюционная динамика структурных и функциональных доменов белка NS1 вирусов гриппа А человека. *Вопросы вирусологии*. 2017;62(6):246–58. Vasin A.V., Petrova-Brodskaya A.V., Plotnikova M.A., et al. Evolutionary dynamics of structural and functional domains of influenza A virus NS1 protein. *Problems of Virology*. 2017;62(6):246–58. DOI: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-246-258> EDN: <https://elibrary.ru/zucqetp>
18. Evseev D., Magor K.E. Molecular evolution of the influenza A virus non-structural protein 1 in interspecies transmission and adaptation. *Front. Microbiol*. 2021;12:693204. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.693204>
19. Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Pazynina G.V., et al. 6-sulfo sialyl Lewis X is the common receptor determinant recognized by H5, H6, H7 and H9 influenza viruses of terrestrial poultry. *Virol. J*. 2008;5:85. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-85>
20. Marinova-Petkova A., Laplante J., Jang Y., et al. Avian influenza A(H7N2) virus in human exposed to sick cats, New York, USA, 2016. *Emerg. Infect. Dis*. 2017;23(12):2046–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2312.170798>
21. Hatta M., Zhong G., Gao Y., et al. Characterization of a feline influenza A(H7N2) virus. *Emerg. Infect. Dis*. 2018;24(1):75–86. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2401.171240>
22. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol*. 1938;27(3):493–7.
23. Ашмарин И.П. Вычисление LD50 при малом числе подопытных животных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1959;30(2):102–8. Ashmarin I.P. Calculation of LD50 with a small number of experimental animals. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1959;30(2):102–8.
24. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., et al. Genetic features of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8), isolated from the European part of the Russian Federation. *Infect. Genet. Evol*. 2018;63:144–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.022>
25. Тимофеева Т.А., Руднева И.А., Ломакина Н.Ф. и др. Мутации в геноме вируса гриппа птиц подтипов H1 и H5, ответственные за адаптацию к млекопитающим. *Независимые микробиологические исследования*. 2021;8(1):50–61. 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. *Microbiology Independent Research Journal*. 2021;8(1):50–61. DOI: <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2021-8-1-50-61> EDN: <https://elibrary.ru/vsvzqt>
26. Subbarao E.K., London W., Murphy B.R. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J. Virol*. 1993;67(4):1761–4. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.67.4.1761-1764.1993>
27. Hatta M., Gao P., Halfmann P., Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*. 2001;293(5536):1840–2. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1062882>
28. Zhang H., Li X., Guo J., et al. The PB2 E627K mutation contributes to the high polymerase activity and enhanced replication of H7N9 influenza virus. *J. Gen. Virol*. 2014;95 (Pt. 4):779–86. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1062882>
29. Suarez D.L., Perdue M.L. Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res*. 1998;54(1):59–69. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(98\)00011-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(98)00011-2)
30. Iwatsuki-Horimoto K., Horimoto T., Fujii Y., Kawaoka Y. Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence. *J. Virol*. 2004;78(18):10149–55. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.78.18.10149-10155.2004>
31. Ostrowsky B., Huang A., Terry W., et al. Low pathogenic avian influenza A(H7N2) virus infection in immunocompromised adult, New York, USA, 2003. *Emerg. Infect. Dis*. 2012;18(7):1128–31. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1807.111913>

Информация об авторах

Ляшко Александр Викторович — м.н.с. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5714-9461>

Руднева Ирина Александровна — к.б.н., в.н.с. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5000-2547>

Щербинин Дмитрий Николаевич — к.б.н., н.с. лаб. молекулярной биотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Ломакина Наталья Фёдоровна[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, nflomakina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2638-4244>

Трещалина Анастасия Андреевна — м.н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3801-2413>

Куприянова Ирина Михайловна — лаборант-исследователь лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7301-388X>

Гамбарян Александра Сергеевна — д.б.н., в.н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1892-0548>

Тимофеева Елена Борисовна — инженер-исследователь лаб. клеточной микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7352-9808>

Шилов Александр Александрович — д.б.н., в.н.с. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6338-4473>

Садькова Галина Кадымовна — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной генетики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2729-6767>

Прилипов Алексей Геннадьевич — д.б.н., в.н.с., зав. лаб. молекулярной генетики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8755-1419>

Тимофеев Борис Игоревич — к.ф.-м.н., с.н.с. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7425-0457>

Шмаров Максим Михайлович — д.б.н., в.н.с., зав. лаб. молекулярной биотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия; доцент каф. инфектологии и вирусологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Рязанова Елена Леонтьевна — к.п.н., доцент каф. медицинской и биологической физики ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1375-3373>

Тимофеева Татьяна Анатольевна — к.б.н., в.н.с., зав. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Участие авторов: *Ляшко А.В.* — эксперименты на животных, вирусологические и серологические исследования, подбор и анализ литературы, написание статьи; *Руднева И.А.* — идея, концепция и дизайн исследования, эксперименты на животных, вирусологические и серологические исследования; *Щербинин Д.Н.* — геномный и протеомный анализ; *Ломакина Н.Ф.* — секвенирование, геномный и протеомный анализ, подбор и анализ литературы, написание статьи, подготовка рукописи к публикации; *Трещалина А.А.* — рецепторная специфичность; *Куприянова И.М.* — эксперименты на животных, вирусологические и серологические исследования; *Гамбарян А.С.* — рецепторная специфичность, критический анализ текста; *Тимофеева Е.Б.* — работа с базами данных и статистическая обработка; *Шилов А.А.* — геномный и протеомный анализ; *Садькова Г.К.* — секвенирование; *Прилипов А.Г.* — секвенирование; *Тимофеев Б.И.* — анализ третичной структуры белков; *Шмаров М.М.* — эксперименты на животных; *Рязанова Е.Л.* — подбор и анализ литературы; *Тимофеева Т.А.* — идея, концепция и дизайн исследования, эксперименты на животных, вирусологические и серологические исследования, написание статьи. Все авторы

Information about the authors

Aleksandr V. Lyashko — junior researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5714-9461>

Irina A. Rudneva — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5000-2547>

Dmitrii N. Shcherbinin — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of molecular biotechnology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Natalia F. Lomakina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, nflomakina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2638-4244>

Anastasia A. Treshchalina — junior researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune and Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3801-2413>

Irina M. Kupriyanova — laboratory researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7301-388X>

Alexandra S. Gambaryan — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for the Research and Development of Immune and Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1892-0548>

Elena B. Timofeeva — research engineer, Laboratory of cellular microbiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7352-9808>

Aleksandr A. Shilov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6338-4473>

Galina K. Sadykova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular genetics, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2729-6767>

Alexey G. Prilipov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of molecular genetics, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8755-1419>

Boris I. Timofeev — Cand. Sci. (Phys.-Math.), senior researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7425-0457>

Maxim M. Shmarov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of molecular biotechnology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia; Assistant professor, Department of infectology and virology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Elena L. Ryzanova — Cand. Sci. (Pedagogy), Assistant professor, Department of medical and biological physics, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1375-3373>

Tatiana A. Timofeeva — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Author contribution: *Lyashko A.V.* — animal experiments, virological and serological studies, collection and analysis of literature, writing an article; *Rudneva I.A.* — idea, concept and design of research, animal experiments, virological and serological studies; *Shcherbinin D.N.* — genomic and proteomic analysis; *Lomakina N.F.* — sequencing, genomic and proteomic analysis, collection and analysis of literature, writing an article, preparation of the manuscript for

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 28.09.2023;
принята к публикации 18.11.2023;
опубликована 28.12.2023

publication; *Treshchalina A.A.* — receptor specificity; *Kupriyanova I.M.* — animal experiments, virological and serological studies; *Gambaryan A.S.* — receptor specificity, critical analysis of the text; *Timofeeva E.B.* — working with databases and statistical processing; *Shilov A.A.* — genomic and proteomic analysis; *Sadykova G.K.* — sequencing; *Prilipov A.G.* — sequencing; *Timofeev B.I.* — analysis of the tertiary structure of proteins; *Shmarov M.M.* — animal experiments; *Ryazanova E.L.* — collection and analysis of literature; *Timofeeva T.A.* — idea, concept and design of research, animal experiments, virological and serological studies, writing an article. 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 work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 28.09.2023;
accepted for publication 18.11.2023;
published 28.12.2023