

MPHTI: 34.25.21

Б.Т. БАЙҚАРА^{1,2*}, Е.Т. КАСЫМБЕКОВ¹, Е.Я. ХАН¹, К.Д. ДАУЛБАЕВА¹,
С.Ш. НУРАЛИБЕКОВ¹, Т.Б. САБЫРЖАН^{1,2}, S.R. FEREDOUNI³,
К.О. КАРАМЕНДИН¹, А.И. КЫДЫРМАНОВ¹

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

³Научно-исследовательский институт экологии дикой природы Венского ветеринарного университета, Вена, Австрия

*e-mail: baikara.barshagul@gmail.com

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ШТАММА ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ А/MUTE SWAN/MANGYSTAU/9421/2022, ИЗОЛИРОВАННОГО ОТ ЗИМУЮЩИХ ПТИЦ НА ПОБЕРЕЖЬЕ КАСПИЙСКОГО МОРЯ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.08

Аннотация

В данной статье представлены результаты сравнительного молекулярно-генетического анализа полного генома высокопатогенного вируса гриппа А A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1). Исследование проведено на изоляте, полученном от погибшего лебедя-шипуна (*Cygnus olor*) во время вспышки инфекции среди водоплавающих птиц, зимующих на Мангистауском побережье Каспия. В результате исследования данный изолят определен как высокопатогенный штамм, относящийся к H5 клада 2.3.4.4b.

Ключевые слова: грипп птиц, секвенирование, филогенетический анализ, патогенность.

Вирус гриппа А, принадлежащий к семейству *Orthomyxoviridae* рода *Alphainfluenzavirus*, представляет собой одноцепочечные РНК-вирусы с минус нитью и сегментированным геномом [1]. Вирусы гриппа (ВГ) птиц отличаются по поверхностным белкам гемагглютинаина и нейраминидазы. Описано 19 различных подтипов гемагглютинаина (H1-H19) [2] и 11 подтипов нейраминидаз (N1-N11) [3] ВГ. Каждый подтип вируса характеризуется определенной комбинацией гемагглютинаина и нейраминидазы, которой он обладает. Геномы ВГ птиц состоят из восьми различных генных сегментов из рибонуклеиновых кислот (РНК). Вирион гриппа включает следующие белки: гемагглютинин (НА), нейраминидазу (НА), матричный (М1), белок протонного ионного канала (М2), нуклеопротеин (NP), основной белок полимеразы 1 (PB1), основной белок полимеразы 2 (PB2), кислотный белок полимеразы (РА) и неструктурные белки 1 (NS1) и 2 (NS2) [4]. В зависимости от вирулентности ВГ у домашних и диких птиц он может классифицироваться как низкопатогенный грипп птиц или высокопатогенный грипп птиц (ВПГП) [5, 6]. Возбудители большинства инфекций гриппа птиц у домашних кур – штаммы низкопатогенного гриппа птиц, которые вызывают легкую форму заболевания с проявлением респираторных, кишечных или репродуктивных признаков. ВПГП, следовательно, вызывает у птиц тяжелую форму болезни и приводит к высокой смертности. ВПГП продолжает циркулировать в орнитофауне и периодически поражает домашних птиц [7].

До сегодняшнего дня вспышки ВПГП среди домашних птиц вызывались штаммами H5 или H7, которые, однако, редко выявлялись в популяциях диких птиц. Несмотря на это, в последние годы возникли высоковирулентные штаммы ВГ птиц H5N1, которые проявили способность инфицировать как домашних, так и многие виды диких птиц [8, 9], увеличивая риск рекомбинации птичьих и человеческих штаммов. Так, в 2005 г. в Восточной Азии 112 человек заразились вирусом H5N1, в результате чего 57 человек погибли. Большинство этих

случаев среди людей произошло в результате прямого контакта с инфицированной домашней птицей или птичьим пометом [10]. Осенью 2020 года во многих местах Казахстана начался падеж от птичьего гриппа диких водно-болотных птиц, мигрировавших на юг, вскоре началась гибель домашней птицы. Во время вспышек H5N8 общая потеря птицы на конец 2020 г. составила 2 млн голов [11].

Цель данного исследования: молекулярно-генетическая характеристика патогенности штамма вируса гриппа A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1), выделенного от погибшего лебедя-шипун (*Cygnus olor*) во время вспышки инфекции среди водоплавающих птиц, зимующих на Мангистауском побережье Каспия.

Материалы и методы исследования

Сбор клинических образцов. Трахеальные и клоакальные смывы павших птиц были взяты с соблюдением сертифицированных методик, рекомендованных ВОЗ и Международным Эпизоотическим Бюро [12, 13]. Смывы брали стерильным ватным тампоном с пластиковой ручкой, помещали во флаконы с вирус транспортировочной средой, содержащей комплекс антибиотиков (пенициллин 2000 ед/мл, стрептомицин 2 мг/мл, гентамицин 50 мкг/мл, нистатин 50 ед/мл) и бычий сывороточный альбумин в конечной концентрации 0,5%. Пробы до проведения исследований хранили в жидком азоте (-196°C).

Изоляция вируса. Выделение вируса проводили путем инокуляции ПЦР-положительного образца в аллантоисную полость трех 10-11-дневных развивающихся куриных эмбрионов и последующей инкубацией при +37°C в течение 48 ч. Наличие вируса в аллантоисной жидкости проверяли микрометодом РГА с использованием 0,75% суспензии куриных эритроцитов [14]. Вирус был обнаружен при первичном заражении и было проведено клонирование с предельным разведением 10^{-1} , 10^{-3} и 10^{-5} . Для исследования вируса использовали 10^{-5} разведение с титром 1:512. Выделение РНК из смывов проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden), в соответствии с рекомендациями производителя из 140 мкл смыва.

Обратная транскрипция и мультиплекс ПЦР (ОТ-ПЦР). Скрининг образцов РНК на принадлежность к вирусам гриппа А в мультиплекс ОТ-ПЦР проводили одновременно в одношаговой реакции с набором OneTaq® One-Step RT-PCR Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) с праймерами к М, Н5 и N1 генам вируса гриппа А [15]. Для контроля специфичности мультиплекс ПЦР использовали выделенный и идентифицированный в лаборатории экологии вирусов НПЦ микробиологии и вирусологии вирус гриппа А/лебедь шипун/Актау/1460/06 (H5N1). При приготовлении реакционной смеси использовали праймеры к матричному гену, генам НА Н5 и NA N1.

Таблица 1 - Список праймеров для полного секвенирования генома ВГ

№ п/п	Название гена (длина)	Название праймера: 3' прямая нуклеотидная последовательность	Название праймера: 5' обратная нуклеотидная последовательность	Длина ожидаемого продукта
1	2	3	4	5
1	PB2 (2341)	PB2 F1: AGC AAA AGC AGG TCA [16]	PB2 R 1032: CTY GTT CTT TTG AAA GTG AA [16]	1032
		PB2 F781: GAG AAA TGA TGA TGT TGA CCA [16]	PB2 R 1734: GGR TCT TGT GAC CAT TGA AT [16]	953
		PB2 F 1625: TCG TCA TCA ATG ATG TGG GA [16]	R5 REV: TAA TAC GAC TCA CTA TAA GTA [16]	718
2	PB1 (2341)	Bm-PB1-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGC A [16]	PB1-1262R: TTR AAC ATG CCC ATC ATC AT [17]	1262

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
		PB2-1124F: ARA TAC CNG CAG ARA TGC T [17]	Bm-PB1-2341R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT [16]	1217
3	PA (2233)	Bm-PA-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGT AC [16]	PA-1498R: TNG TYC TRC AYT TGC TTA TCA T [17]	1498
		PA-747F: CAT TGA GGG CAA GCT TTC [17]	Bm-PA-2233R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT [16]	1486
4	HA (1778)	SZAHAF: CTC GAG AGC AAA AGC AGG GG [16]	SZAHAR: AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT [16]	1778
5	NP (1565)	SZANPF: CTC GAG AGC AAA AGC AGG GT [18]	E001 NP-734R: ATT TTC CCT TTG AGG ATG TTG CAC ATT C [17]	734
		E003 NP-517F: GGA ATG GAY CCC AGG ATG TGC TC [17]	SZANPR: AGT AGA AAC AAG GGT ATT TTT C [18]	1048
6	NA (1413)	SZANAF: AGC AAA AGC AGG AGT TTA AAA TG [18]	SZANAR: AGT AGA AAC AAG GAG TTT TTT [16]	1413
7	M (1027)	SZAMF: CTC GAG CAA AAG CAG GTA GAT [18]	SZAMR: AGC AAA AGC AGG GTG ACA AA [18]	1027
8	NS (890)	SZANSF: AGC AAA AGC AGG GTG ACA AA [18]	SZANSR: ATG AGA AAC AAG GGT GTT TTT T [18]	890

Секвенирование генома. Для амплификации всего генома гриппа А использовали 13 пар праймеров [16-18] (таблица 1). Были амплифицированы все восемь генных сегментов с 2-3 перекрывающимися продуктами ПЦР для обеспечения качества последовательности с обоих направлений. ОТ-ПЦР проводили с использованием набора для одноступенчатой ОТ-ПЦР OneTaq (NEB, США) в соответствии с протоколом производителя. Амплификация проводилась при следующих параметрах: обратная транскрипция при 48°C 45 мин, начальная - 2 мин денатурация при 95°C и амплификация в 40 циклов, включающая денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг праймеров (56°C, 20 сек) и удлинение цепи (72°C, 2 мин) с последующей окончательной элонгацией при 72°C, 10 мин. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Продукты ОТ-ПЦР вырезали из геля и очищали с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, США). Секвенирование ДНК проводили на очищенных продуктах ПЦР с использованием набора для секвенирования BigDye Terminator v3.1 (ABI, Фостер-Сити, Калифорния) на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies, Калифорния, США). Секвенирование каждого продукта ПЦР проводили с обеих сторон. Большинство последовательностей содержат уникальные пики со значениями качества выше 40. Полученные последовательности были сопоставлены с другими штаммами вируса птичьего гриппа H5 из GenBank (алгоритм Clustal W) и построены филогенетические деревья с использованием метода объединения соседей и алгоритма модели Tamura-Nei [19] с программным обеспечением MEGA 7.0 [20].

Результаты и обсуждение

Исследованы биологические образцы в виде трахеальных и клоакальных смывов, собранных от одиннадцати павших птиц: десяти лебедей-шипуну (*Cygnus olor*) и одного лебедя-кликуну (*Cygnus cygnus*), зимовавших на озере Караколь (Карагие-Каракольский государственный заказник 43°63'18"N 51°19'3"E) в Мангистауском побережье Каспия в декабре 2022 г.

В результате ПЦР-скрининга биоматериалов от павших лебедей обнаружены фрагменты М-гена вируса гриппа А в 17 пробах (8 трахеальных, 9 клоакальных). Гены HA

и NA в положительных образцах амплицировались с помощью праймеров, специфичных к подтипам H5 и N1.

Штамм вируса гриппа A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) был изолирован из клоакальных смывов погибшего лебедя-шипунa на 10-11-дневных развивающихся куриных эмбрионах.

Полногеномное секвенирование и BLASTn анализы показали значительное генетическое сходство штамма вируса гриппа A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 по всем восьми генам с высокопатогенными эпизоотическими вариантами ВГ, изолированными от домашних и диких птиц в Восточной Европе и Африке (таблица 2) [21]. Как видно из таблицы 1, донорами шести из восьми генов изучаемого штамма являлись высокопатогенные варианты вируса гриппа H5N1.

Молекула гемагглютини́на вируса A/H5N1 содержит локус патогенности. Во время посттрансляционного процессинга предшественник HA подвергается протеолитическому расщеплению на фрагменты HA1 и HA2 под действием протеаз, синтезируемых инфицированными клетками [22, 23]. Патогенность ВГ в основном определяют по сайту расщепления. Аминокислотный состав сайта расщепления HA штамма A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 состоит из последовательности KRRKR/GLF, что возможно идентичное мотиву высокопатогенных вариантов ВГ птиц, обнаруженных в европейских странах, включая Великобританию в 2016–2017 гг.

Таблица 2 - Сравнение нуклеотидных последовательностей сегментов генома штамма гриппа A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) с таковыми наиболее близкими штаммами в GenBank

Ген или сегмент	Размер (нуклеотиды)	Содержание GC (%)	Ближайший родственник	Идентичность на уровне нуклеотидов (%)	Регистрационный номер ближайшего родственника в GenBank
PB2	2,292	44.6	A/dalmatian pelican/Astrakhan/41 7-2/2021	99.02	OP597563.1
PB1	1,489	47.7	A/Anas platyrhynchos/Belgium/10402_H195386/2017 (H1N1)	97.85	MT439902.1
PA	1,194	41.8	A/pelican/Dagestan/397-1/2021(H5N5)	96.97	OP597572.1
HA	1,708	41.7	A/chicken/Nigeria/VRD21-37_21VIR2288-2/2021(H5N1)	98.65	MW961468.1
NP	1,527	47.8	A/duck/Bangladesh/51601/2021(H5N1)	99.07	OP030703.1
NA	1,393	44.5	A/goose/Chelyabinsk/1341-3/2021(H5N1)	98.85	OP597622.1
M	960	50.3	A/ibis/Egypt/RLQP-229S/2022(H5N1)	99.17	OP491852.1
NS	861	43.9	A/mallard/Ukraine/A N-223-13-01/2020(H7N3)	98.72	MW856000.1

Для филогенетического анализа были отобраны штаммы вируса ВПП подтипа H5N1, циркулировавшие среди домашних и диких птиц в Евразии и Африке в период с 2020 по 2022 год. В филогениях ген HA вируса A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 кластеризуется с вирусами подтипа H5N1, обнаруженными среди домашних и диких птиц в России, Китае и

Индии, а также на Ближнем Востоке и в Западной Африке. Филогенетическое дерево гена НА показывает, что штамм из этого исследования, как и ранее описанные штаммы из Казахстана (номер ссылки GISAID EPI_ISL_2932614) [11] и GenBank NCBI OP740959.1 [24], принадлежит к кладу H5 2.3.4.4b вирусов ВПГП (рисунок 1).

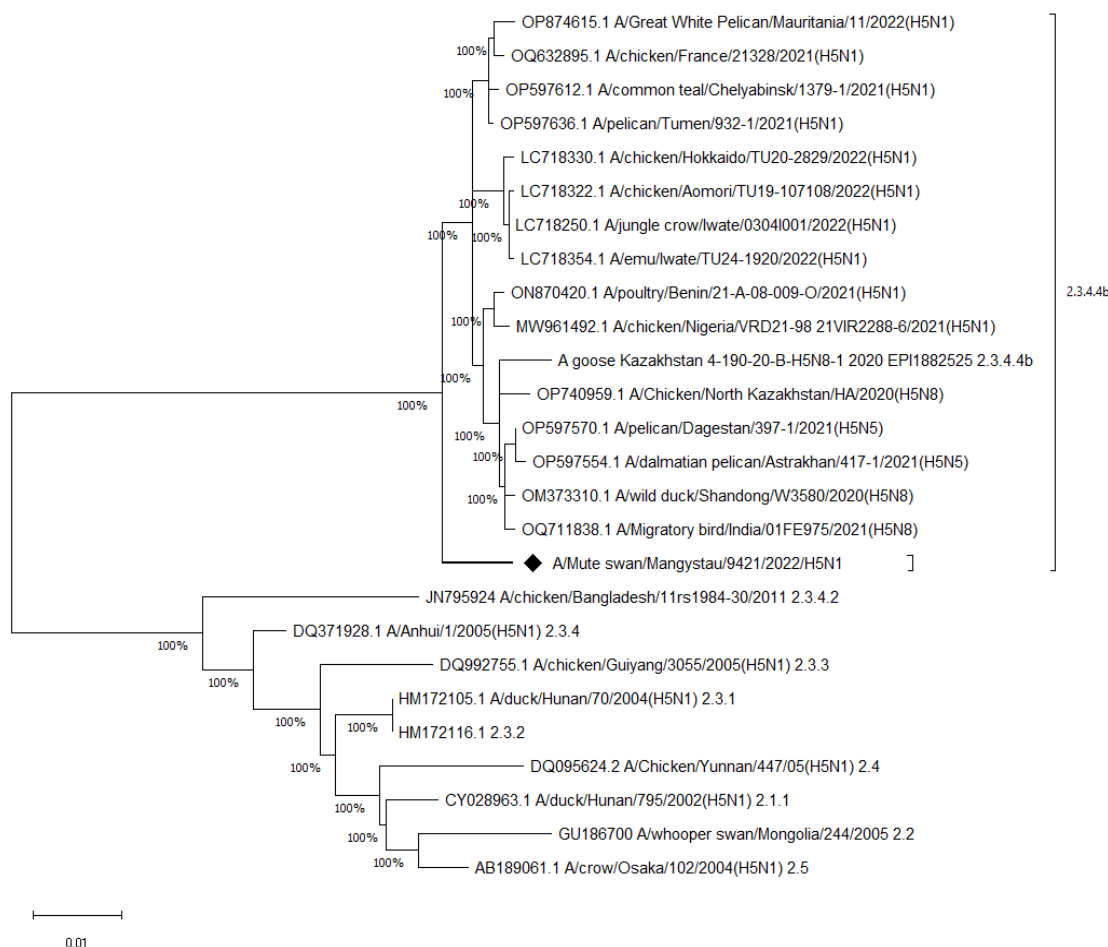


Рисунок 1 - Филогенетическая топология гена НА вируса гриппа A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1)

С точки зрения патогенности, представляют интерес следующие гены вируса гриппа А и кодируемые ими белки: НА, М2, NS1 и PB1-F2 [25].

Способность НА распознавать клеточные рецепторы хозяина связана со структурой рецепторсвязывающего сайта [26]. В белке НА исследуемого штамма выявлена замена аминокислотного остатка в положении 156 треонина на аланин, который может приводить к повышенному связыванию с рецепторами сиаловой кислоты ($\alpha 2,6$ -SA) [27].

Вирулентность штаммов ВГ также связывают с особенностями строения белка NS. Два продукта его посттрансляционного расщепления – белки NS1 и NS2 участвуют в регуляции многочисленных аспектов жизненного цикла вируса гриппа и могут влиять на их патогенные свойства [28]. Обнаружены аминокислотные замены в белке NS1 исследуемого штамма A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 – замена Pro на Ser в положении 42 и Val - на Ala в положении 149 в белке NS1, связаны с вирулентностью и патогенностью у мышей. Также было обнаружено, что мутация NS1, такая как Pro42Ser, модулирует вирулентность вирусов H5N1 [29].

Изолят A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 содержал замену Ala на Lys в 184 положении белка NP, который увеличивает репликацию и патогенность H5N1 [30]. Выявление в белке NP аминокислотного остатка как лейцин в 136 положении, изолейцина

в 109 положении и валина в 33 положении указывает на вирусы, схожие с изолированными от птиц, тогда как обнаружение метионина, валина и изолейцина в этих же положениях указывает на вирусы, подобные выделенным от человека [31]. У исследуемого изолята обнаружены Leu136, Ile109 и Val33, то есть аминокислотные остатки подобные птичьим.

Филогенетический анализ белка NA исследуемого вируса A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 показал ближайшее родство с вирусами, выявленными в Бангладеш и Японии (рисунок 2).

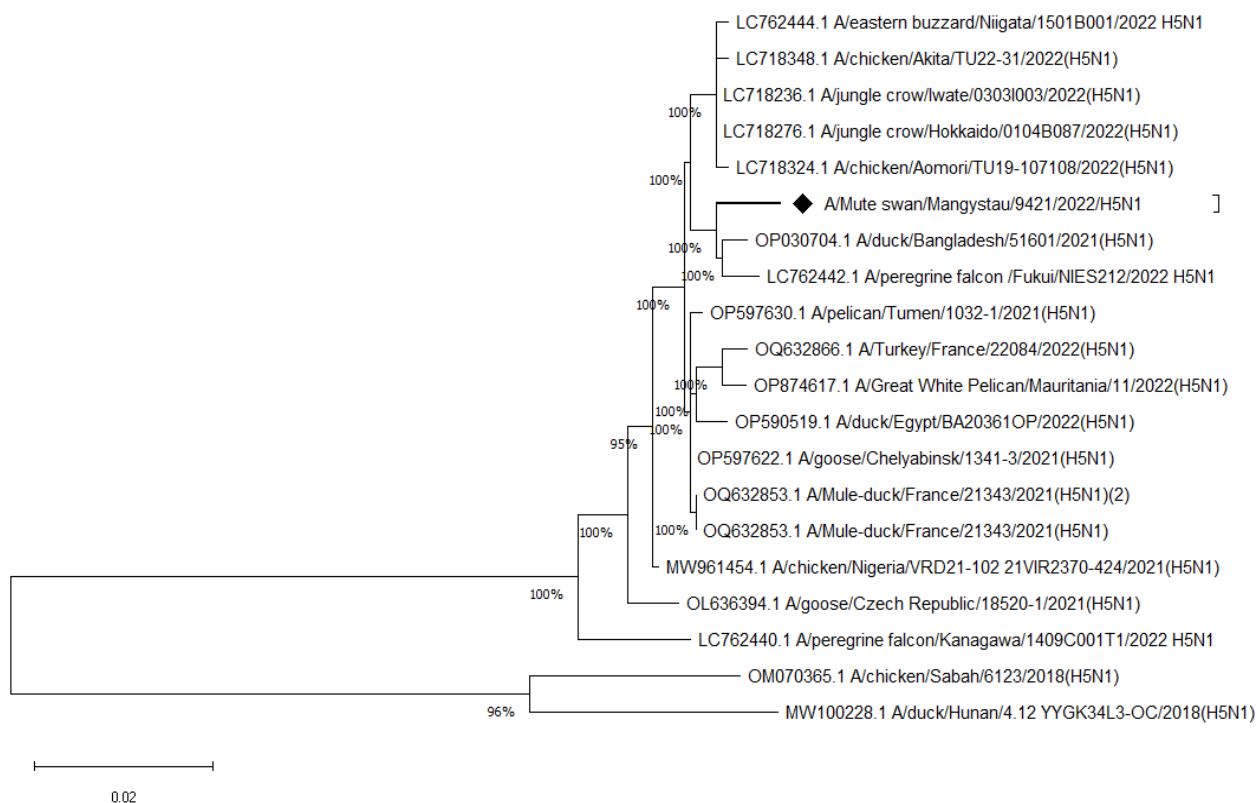


Рисунок 2 - Филогенетическое дерево гена NA A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) и других вирусов, циркулирующих по всему миру

Аминокислотная замена Lys389Arg в белке PB2 повышает полимеразную активность ВГ в клетках млекопитающих [32, 33] и эта замена была выявлена в результате секвенирования генома исследуемого штамма H5N1.

Аминокислотные замены Leu89Val, Gly309Asp, Thr339Lys, Arg477Gly, Ile495Val и Lys627Glu были отмечены в изоляте A/Mute swan/Mangystau/9421/2022. Было описано, что эти замены в полимеразном белке PB2 в сочетании с изменениями в полипептидах M1 и NA повышают активность и вирулентность полимеразы у мышей [34].

Выявлены уникальные замены аминокислотных остатков в нескольких белках: NA – Asn3Lys и Ala511Ser; NA – Glu287Gly, Gln308His, Val394Ile, Ala395Glu и Ser442Ile; M2 – Gln164Leu; NS1 – Ala76Thr, Ile81Asp и Val85Pro.

Заключение

Проведенные исследования показали, что изолят A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) относится к ВПГП H5 клада 2.3.4.4b. Определены полные нуклеотидные последовательности всех восьми сегментов генома данного штамма. Анализ нуклеотидной последовательности гена NA и NA вируса гриппа H5N1 показал идентичность 98,65% A/chicken/Nigeria/VRD21-37_21VIR2288-2/2021 (H5N1) и 98,85% A/goose/Chelyabinsk/1341-

3/2021(H5N1), соответственно. Выявлены значимые изменения в геноме вируса, такие как аминокислотные замены в белке HA Thr156Ala (приводящие к повышенному связыванию вируса с рецепторами клеток-хозяина), NS Pro42Ser и Val149Ala (модулирующий вирулентность и патогенность вирусов H5N1), NP Ala184Lys (увеличивающий репликацию вируса H5N1), которые обусловлены патогенностью данного штамма. В геноме вируса A/H5N1 выявлен ряд молекулярных маркеров, свидетельствующих о высокой патогенности штамма для птиц отряда куриных и млекопитающих и не обнаружены мутации, облегчающие инфицирование людей.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта AP0925899 "Молекулярная эволюция и экология вирусов гриппа А, циркулирующих среди диких птиц в Казахстане и выявление нового подтипа" выполняемого в рамках Договора на грантовое финансирование по научным и (или) научно-техническим проектам на 2021-2023 годы (Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан).

Литература:

- 1 Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res*, 2018; 46: D708-D717. (doi: 10.1093/nar/gkx932)
- 2 Fereidouni S., Starick E., Karamendin K., Di Genova C., D. Scott S., Khan Y., Harder T. and Kydyrmanov A. Genetic characterization of a new candidate hemagglutinin subtype (H19) of influenza A viruses. *Emerging Microbes & Infections*, 2023; (doi: 10.1080/22221751.2023.2225645).
- 3 Wu Ying, Wu Yan, Tefsen B., Shi Y., Gao G.F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology*, 2014; 22(4): 183–191. (doi: 10.1016/j.tim.2014.01.010.52)
- 4 AbuBakar U., Amrani L., Kamarulzaman F.A., Karsani S.A., Hassandarvish P., Khairat J.E. Avian Influenza Virus Tropism in Humans. *Viruses*, 2023; 15, 833. (doi: 10.3390/v15040833)
- 5 Donis R. O. and G. J. Smith. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013–2014. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2014; 9 (5): 271-6. (doi: 10.1111/irv.12324)
- 6 Zhou X., Gao L., Wang Y., Li Y., Zhang Y., Shen C., Liu A., Yu Q., Zhang W., Pekin A., Guo F., Smith C., Clements A.C.A., Edwards J., Huang B., Soares Magalhães R.J. Geographical variation in the risk of H7N9 human infections in China: implications for risk-based surveillance. *Sci Rep.*, 2020; 10(1): 10372. (doi: 10.1038/s41598-020-66359-1)
- 7 Lewis N.S., Banyard A.C., Whittard E., Karibayev T., Al Kafagi T., Chvala I., Byrne A., Meruyert A., King J., Harder T., Grund C., Essen S., Reid S.M., Brouwer A., Zinyakov N.G., Tegzhanov A., Irza V., Pohlmann A., Beer M., Fouchier R.A.M., Akhmetzhan A.S, Brown I.H. 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: 148–151. (doi: 10.1080/22221751)
- 8 Cha R.M., Lee Y-N., Park M-J., Baek Y-G., Shin J-I., Jung C.H., Sagong M., Heo G-B., Kang Y-M., Lee K-N., et al. Genetic Characterization and Pathogenesis of H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Virus Isolated in South Korea during 2021–2022. *Viruses*, 2023; 15(6):1403. (doi: 10.3390/v15061403)
- 9 Байкара Б.Т., Садуакасова М.А., Карабасова А.С., Жусупбеков Ж.С., Султанов А.А. Эпизоотологический мониторинг гриппа домашней птицы. Вестник КазНУ. Серия биологическая, 2021; 3(88): 79-86. (doi: 10.26577/eb.2021.v88.i3.08)
- 10 World Health Organization. Communicable disease surveillance and response (CSR): Avian influenza. Available: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/. Accessed 19 August 2005.
- 11 Amirgazin A., Shevtsov A., Karibayev T., Berdikulov M., Kozhakhmetova T., Syzdykova L., Ramankulov Y., Shustov A.V. Highly pathogenic avian influenza virus of the A/H5N8 subtype, clade 2.3.4.4b, caused outbreaks in Kazakhstan in 2020. *PeerJ*, 2022; 10: e13038. (doi: 10.7717/peerj.13038)
- 12 WHO/CDS/CSR/NCS/ Manual for on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Geneva, 2002.–P. 15-18.
- 13 Office International des Epizooties (OIE), Manual of standards for diagnostic tests and vaccines.– Paris, 2000

- 14 Reed L., Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints // *J. Amer. Hyg.*, 1938; 2: 493-497. (doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408)
- 15 Kydyrmanov A., Sayatov M., Karamendin K., Zhumatov K., Asanova S., Daulbayeva K., Starick E., Fereidouni S. Monitoring of influenza A viruses in wild bird populations in Kazakhstan in 2002-2009. *Arch Virol.*, 2017; Jan;162(1):147-155. (doi: 10.1007/s00705-016-3076-4)
- 16 Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*, 2001; 146: 2275–2289. (doi: 10.1007/s007050170002)
- 17 Li O.T.W., Barr I., Leung C.Y.H., Chen H., Guan Y., et al. Reliable universal RT-PCR assays for studying influenza polymerase subunit gene sequences from all 16 hemagglutinin subtypes. *J Virol Methods*, 2007; 142: 218-222. (doi: 10.1016/j.jviromet.2007.01.015.)
- 18 Obenauer J.C., Denson J., Mehta P.K., Su X., Mukatira S., et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*, 2006; 311: 1576 – 1580. (doi: 10.1126/science.1121586.)
- 19 Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 1993; 10: 512–526. (doi: 10.1093/oxfordjournals .molbev.a040023)
- 20 Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016; 33: 1870–1874. (doi: 10.1093/molbev/msw054)
- 21 Brookes S.M., Mansfield K.L., Reid S.M., Coward V., Warren C., Seekings J., Brough T., Gray D., Núñez A., Brown I.H. Incursion of H5N8 high pathogenicity avian influenza virus (HPAIV) into gamebirds in England. *Epidemiol Infect*, 2022; 150: e51. (doi:10.1017/S0950268821002740)
- 22 Luczo J.M., Stambas J., Durr P.A., Michalski W.P., Bingham J. Molecular pathogenesis of H5 highly pathogenic avian influenza: the role of the haemagglutinin cleavage site motif. *Rev Med Virol*, 2015; 25(6): 406–430. (doi: 10.1002/rmv.1846)
- 23 Russell C.J. Hemagglutinin Stability and Its Impact on Influenza A Virus Infectivity, Pathogenicity, and Transmissibility in Avians, Mice, Swine, Seals, Ferrets, and Humans. *Viruses*, 2021; 13, 746. (doi: 10.3390/v13050746)
- 24 Baikara B., Seidallina A., Baimakhanova B., Kasymbekov Y., Sabyrzhan T., Daulbaeva K., Nuralibekov S., Khan Y., Karamendin K., Sultanov A., Kydyrmanov A. Genome Sequence of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/Chicken/North Kazakhstan/184/2020(H5N8). *Microbiology Resource Announcements*, 2023; 12: 6 (doi: 10.1128/mra.01151-22)
- 25 Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol.*, 1999; 73(2): 1146-55. (doi: 10.1128/JVI.73.2.1146-1155.1999.)
- 26 Weis, W., Brown, J., Cusack, S. *et al.* Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 1988; **333**: 426–431. (doi: 10.1038/333426a0)
- 27 Linster M., van Boheemen S., de Graaf M., Schrauwen E.J.A., Lexmond P., Mänz B., Bestebroer T.M., Baumann J., van Riel D., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E., Matrosovich M., Fouchier R.A.M., Herfst S. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell*, 2014; 10; 157(2): 329-339. (doi: 10.1016/j.cell.2014.02.040)
- 28 Li Z., Jiang Y., Jiao P., Wang A., Zhao F., Tian G., Wang X., Yu K., Bu Z., Chen H. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol*, 2006; 80: 11115–11123 (doi: 10.1128/JVI.00993-06)
- 29 Jackson D., Hossain M.J., Hickman D., Perez D.R., Lamb R.A. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci*, 2008; 105(11): 4381–4386. (doi: 10.1073/pnas.0800482105.)
- 30 Wasilenko J. L., Sarmiento L., Pantin-Jackwood M. J. A single substitution in amino acid 184 of the NP protein alters the replication and pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in chickens. *Arch Virol*, 2009; 154, 969–979 (doi: 10.1007/s00705-009-0399-4)
- 31 Chen G. W., Chang S. C., Mok C. K., Lo Y. L., Kung Y. N., Huang J. H., Shih Y. H., Wang J. Y., Chiang C. et al. Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12, 1353–1360 (doi: 10.3201/eid1209.060276)
- 32 Yamayoshi S., Yamada S., Fukuyama S., et al. Virulence-affecting amino acid changes in the PA protein of H7N9 influenza A viruses. *J Virol*, 2014; 88: 3127–3134. (doi: 10.1128/JVI.03155-13.)
- 33 Yamayoshi S., Kiso M., Yasuhara A., et al. Enhanced replication of highly pathogenic influenza A(H7N9) virus in humans. *Emerg Infect Dis*, 2018; 24: 746–750. (doi: 10.3201/eid2404.171509.)

34 Alkie T.N., Cox S., Embury-Hyatt C., Stevens B., Pople N., Pybus M.J., Xu W., Hisanaga T., Suderman M., Koziuk J., Kruczkiewicz P., Nguyen H.H., Fisher M., Lung O., Erdelyan C.N.G., Hochman O., Ojic D., Yason C., Bravo-Araya M., Bourque L., Bollinger T.K., Soos C., Giacinti J., Provencher J., Ogilvie S., Clark A., MacPhee R., Parsons G.J., Eaglesome H., Gilbert S., Saboraki K., Davis R., Jerao A., Ginn M., Jones M.E.B., Berhane Y. Characterization of neurotropic HPAI H5N1 viruses with novel genome constellations and mammalian adaptive mutations in free-living mesocarnivores in Canada. *Emerg Microbes Infect*, 2023; 12(1): 2186608. (doi: 10.1080/22221751.2023.2186608.)

Б.Т. БАЙҚАРА^{1,2*}, Е.Т. ҚАСЫМБЕКОВ¹, Е.Я. ХАН¹, К.Д. ДАУЛБАЕВА¹,
С.Ш. НУРАЛИБЕКОВ¹, Т.Б. САБЫРЖАН^{1,2}, S.R. FERREIDOUNI³,
К.О. КАРАМЕНДИН¹, А.И. ҚЫДЫРМАНОВ¹

¹Микробиология және вирусология ғылыми-зерттеу орталығы, Алматы, Қазақстан

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

³Вена ветеринарлық университетінің Жабайы табиғат экологиясы ғылыми-зерттеу институты, Вена, Австрия

*e-mail: baikara.barshagul@gmail.com

КАСПИЙ ТЕҢІЗИ ЖАҒАЛАУЫНДА ҚЫСТАЙТЫН ҚҰСТАРДАН БӨЛІНГЕН ЗАРДАПТЫЛЫҒЫ ЖОҒАРЫ ҚҰС ТҰМАУЫ ВИРУСЫ А/MUTE SWAN/MANGYSTAU/9421/2022 ШТАМЫНЫҢ МОЛЕКУЛАЛЫ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ СИПАТТАМАСЫ

Түйін

Осы мақалада зардаптылығы жоғары А/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) құс тұмауы вирусының толық геномына салыстырмалы молекулалы-генетикалық талдау нәтижелері көрсетілген. Каспий теңізінің Маңғыстау жағалауында қыстайтын, су құстары арасында ауру өршіген уақытта сыбырлақ аққудан (*Cygnus olor*) алынған изолят зерттелді. Зерттеу нәтижесінде осы изолят H5 2.3.4.4b кладына жататын, зардаптылығы жоғары штамм екені анықталды.

Кілтті сөздер: құс тұмауы, тізбектеу, филогенетикалық талдау, зардаптылық.

IRSTI: 34.25.21

Б.Т. БАЙҚАРА^{1,2*}, Е.Т. КАСЫМБЕКОВ¹, Е.Я. ХАН¹, К.Д. ДАУЛБАЕВА¹,
С.Ш. НУРАЛИБЕКОВ¹, Т.Б. САБЫРЖАН^{1,2}, S.R. FERREIDOUNI³, К.О. КАРАМЕНДИН¹,
А.И. КЫДЫРМАНОВ¹

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Kazakh National University named after al-Farabi, Almaty, Kazakhstan

³Research Institute of Wildlife Ecology, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria

*e-mail: baikara.barshagul@gmail.com

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF A HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA STRAIN A/MUTE SWAN/MANGYSTAU/9421/2022 ISOLATED FROM BIRDS WINTERING ON THE COAST OF THE CASPIAN SEA

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.08

Abstract

This article presents the results of a comparative molecular genetic analysis of the entire genome of the highly pathogenic influenza A virus A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1). The study was carried out on an isolate obtained from a dead mute swan (*Cygnus olor*) during an outbreak of infection among waterfowl wintering on the Mangistau coast of the Caspian Sea. As

a result of the study, this isolate was identified as a highly pathogenic strain belonging to the H5 clade 2.3.4.4b.

Keywords: avian influenza, sequencing, phylogenetic analysis, pathogenicity.

Influenza A virus, belonging to the *Orthomyxoviridae* family of the *Alphainfluenzavirus* genus, is a single-stranded negative sense RNA virus with a segmented genome [1]. Influenza A virus (AIV) are subtyped on the base of surface glycoproteins hemagglutinin and neuraminidase. Nineteen different hemagglutinin subtypes (H1-H19) [2] and 11 subtypes of neuraminidase (N1-N11) [3] have been described. Each virus subtype is characterized by a specific combination of hemagglutinin and neuraminidase that it possesses. Influenza A virus genome is composed of eight distinct ribonucleic acid (RNA) segments. Influenza virion includes the following proteins: hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), matrix (M1), proton ion channel protein (M2), nucleoprotein (NP), polymerase basic protein 1 (PB1), polymerase basic protein 2 (PB2), polymerase acid protein (PA) and non-structural proteins 1 (NS1) and 2 (NS2) [4]. Depending on the virulence of AI in domestic and wild birds, it can be classified as low pathogenic avian influenza or highly pathogenic avian influenza (HPAI) [5, 6]. The causative agents of most avian influenza infections in domestic chickens are low pathogenic avian influenza strains that cause a mild form of the disease along with respiratory, intestinal, or reproductive signs. HPAI cause severe disease in birds and lead to high mortality. HPAI continue to circulate in the avifauna and occasionally affect domestic fowls [7].

Until now, outbreaks of HPAI in poultry have been caused by H5 or H7 strains, which, however, have rarely been detected in wild bird populations. Despite this, in recent years, highly virulent AI H5N1 strains have emerged, which have shown the ability to infect both domestic and many wild bird species [8, 9] and the risk for reassortment of avian and human strains increases. As in 2005 H5N1 viruses have infected 112 human cases in East Asia resulting in 57 deaths. Most of these human cases resulted from direct contact with infected poultry or poultry droppings [10]. During autumn 2020, in many places in Kazakhstan die-offs started by avian influenza in wild wetland birds which had been migrating southwards, soon, death began in poultry. During the H5N8 outbreaks the total loss of poultry was 2 million at the end of 2020 [11].

The aim of this study: molecular genetic characterization of the pathogenicity of the A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) influenza virus strain isolated from a dead mute swan (*Cygnus olor*) during an outbreak of infection among waterfowl wintering on the Mangystau coast of the Caspian Sea.

Materials and methods of research

Collection of clinical specimens. Tracheal and cloacal swabs of dead birds were taken in compliance with certified methods recommended by WHO and the International Epizootic Bureau [12, 13]. The swabs were taken with a sterile cotton swab with a plastic handle, placed in vials with a virus transport medium containing a complex of antibiotics (penicillin 2000 U/ml, streptomycin 2 mg/ml, gentamicin 50 µg/ml, nystatin 50 U/ml) and bovine serum albumin in final concentration 0.5%. Samples were stored in liquid nitrogen (-196°C) prior to testing.

Virus isolation. Virus isolation was carried out by inoculation of a PCR-positive sample into the allantoic cavity of three 10-11-day-old chicken embryos and subsequent incubation at +37°C for 48 hours [14]. The virus was detected during the initial infection and cloning was carried out with the limiting dilution of 10^{-1} , 10^{-3} and 10^{-5} . To study the virus, a 10^{-5} dilution with a titer of 1:512 was used. Isolation of RNA from swabs was performed using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden), according to the manufacturer's recommendations from 140 µl of swab.

Reverse transcription and multiplex PCR (RT-PCR). Screening of RNA samples for belonging to influenza A virus in the RT-PCR multiplex was carried out simultaneously in a one-step reaction with the OneTaq® One-Step RT-PCR Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) with primers for the M, H5 and N1 genes of the influenza virus A [15]. To control the specificity of the

PCR multiplex, we used the influenza virus A/mute swan/Aktau/1460/06 (H5N1) isolated and identified in the Laboratory of Virus Ecology at the Research and Production Center for Microbiology and Virology. When preparing the reaction mixture, primers for the M gene, genes for hemagglutinin H5 and NA N1 were used.

Table 1 - List of primers for whole AIV genome sequencing

№	Gene name (length)	Primer name: 3' forward nucleotide sequence	Primer name: 5' reverse nucleotide sequence	Expected product length
1	PB2 (2341)	PB2 F1: AGC AAA AGC AGG TCA [16]	PB2 R 1032: CTY GTT CTT TTG AAA GTG AA [16]	1032
		PB2 F781: GAG AAA TGA TGA TGT TGA CCA [16]	PB2 R 1734: GGR TCT TGT GAC CAT TGA AT [16]	953
		PB2 F 1625: TCG TCA TCA ATG ATG TGG GA [16]	R5 REV: TAA TAC GAC TCA CTA TAA GTA [16]	718
2	PB1 (2341)	Bm-PB1-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGC A [16]	PB1-1262R: TTR AAC ATG CCC ATC ATC AT [17]	1262
		PB2-1124F: ARA TAC CNG CAG ARA TGC T [17]	Bm-PB1-2341R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT [16]	1217
3	PA (2233)	Bm-PA-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGT AC [16]	PA-1498R: TNG TYC TRC AYT TGC TTA TCA T [17]	1498
		PA-747F: CAT TGA GGG CAA GCT TTC [17]	Bm-PA-2233R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT [16]	1486
4	HA (1778)	SZAHAF: CTC GAG AGC AAA AGC AGG GG [16]	SZAHAR: AGT AGA AAC AAG GGT GTT TTT [16]	1778
5	NP (1565)	SZANPF: CTC GAG AGC AAA AGC AGG GT [18]	E001 NP-734R: ATT TTC CCT TTG AGG ATG TTG CAC ATT C [17]	734
		E003 NP-517F: GGA ATG GAY CCC AGG ATG TGC TC [17]	SZANPR: AGT AGA AAC AAG GGT ATT TTT C [18]	1048
6	NA (1413)	SZANAF: AGC AAA AGC AGG AGT TTA AAA TG [18]	SZANAR: AGT AGA AAC AAG GAG TTT TTT [16]	1413
7	M (1027)	SZAMF: CTC GAG CAA AAG CAG GTA GAT [18]	SZAMR: AGC AAA AGC AGG GTG ACA AA [18]	1027
8	NS (890)	SZANSF: AGC AAA AGC AGG GTG ACA AA [18]	SZANSR: ATG AGA AAC AAG GGT GTT TTT T [18]	890

Genome sequencing. For amplification of the entire influenza A genome, 13 pairs of primers were used [16-18] (table 1). All eight gene segments were amplified with 2-3 overlapping PCR products to ensure sequence quality from both directions. RT-PCR was performed using the OneTaq One-Step RT-PCR Kit (NEB, USA) according to the manufacturer's protocol. Amplification was carried out under the following parameters: reverse transcription at 48°C for 45 min, initial 2 min denaturation at 95°C and amplification for 40 cycles, including denaturation (94°C, 30 sec), primer annealing (56°C, 20 sec) and chain elongation (72°C, 2 min) followed by final elongation at 72°C, 10 min. PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels. RT-PCR products were excised from the gel and purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA). DNA sequencing was performed on purified PCR products using the BigDye Terminator v3.1 sequencing kit (ABI, Foster City, CA) on an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA). Sequencing of each PCR product was performed on both sides. Most of the sequences contain unique peaks with quality values above 40. The obtained sequences were matched with other strains of the H5 avian influenza virus

from GenBank (Clustal W algorithm) and phylogenetic trees were built using the neighbor joining method and the Tamura-Nei model algorithm [19] with software MEGA 7.0 [20].

Results and discussion

Biological samples in the form of tracheal and cloacal swabs collected eleven dead birds: ten mute swan (*Cygnus olor*) and one whooper swan (*Cygnus cygnus*) wintering on Lake Karakol (Karagye-Karakol State Reserve 43°63'18"N 51°19'3"E) in the Mangistau coast of the Caspian Sea in December 2022.

PCR screening of biomaterials from swan carcasses detected fragments of M-gene of influenza A virus in 17 samples (8 tracheal, 9 cloacal). The HA and NA genes in the positive samples were amplified using primers specific for the H5 and N1 subtypes.

The influenza A virus strain A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) was isolated from the cloacal swabs of a dead mute swan on 10-11 day-old chicken embryos.

Whole genome sequencing and BLASTn analyzes showed significant genetic similarity of the A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 influenza virus strain for all eight genes with highly pathogenic epizootic influenza virus variants isolated from domestic and wild birds in the Eastern Europe and Africa (table 2) [21]. As can be seen from Table 1, the donors of six of the eight genes of the studied strain were highly pathogenic variants of the H5N1 influenza virus.

The A/H5N1 virus HA molecule contains the pathogenicity locus. During post-translational processing, the hemagglutinin precursor undergoes proteolytic cleavage into HA1 and HA2 fragments under the action of proteases synthesized by infected cells [22, 23]. The pathogenicity of AIV is mainly determined by the cleavage site. The amino acid composition of the HA cleavage site of strain A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 consists of the KRRKR/GLF sequence, which is possibly identical to the motif of HPAI virus variants found in European countries, including the UK in 2016–2017.

Table 2 - Comparison of the nucleotide sequences of the genome segments of the influenza strain A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) with those of the closest strains in GenBank

Gene or segment	Size (nucleotides)	GC content (%)	Closest relative	Identity at nucleotide level (%)	GenBank accession no. for closest relative
PB2	2,292	44.6	A/dalmatian pelican/Astrakhan/417-2/2021	99.02	OP597563.1
PB1	1,489	47.7	A/Anas platyrhynchos/Belgium/10402_H195386/2017 (H1N1)	97.85	MT439902.1
PA	1,194	41.8	A/pelican/Dagestan/397-1/2021(H5N5)	96.97	OP597572.1
HA	1,708	41.7	A/chicken/Nigeria/VRD21-37_21VIR2288-2/2021(H5N1)	98.65	MW961468.1
NP	1,527	47.8	A/duck/Bangladesh/51601/2021(H5N1)	99.07	OP030703.1
NA	1,393	44.5	A/goose/Chelyabinsk/1341-3/2021(H5N1)	98.85	OP597622.1
M	960	50.3	A/ibis/Egypt/RLQP-229S/2022(H5N1)	99.17	OP491852.1
NS	861	43.9	A/mallard/Ukraine/AN-223-13-01/2020(H7N3)	98.72	MW856000.1

For phylogenetic analysis, HPAI virus strains of the H5N1 subtype were selected that circulated among domestic and wild birds in Eurasia and Africa in the period from 2020 to 2022.

In phylogenies, the HA gene of the A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 virus clustered with viruses of the H5N1 subtype found in poultry and wild birds in Russia, China, and India, as well as in the Middle East and West Africa. The phylogenetic tree of the HA gene shows that the strain from this study, like the previously described strains from Kazakhstan (reference number GISAID EPI ISL 2932614) [11] and GenBank NCBI OP740959.1 [24], belongs to the H5 clade 2.3.4.4b of HPAI viruses (Fig. 1).

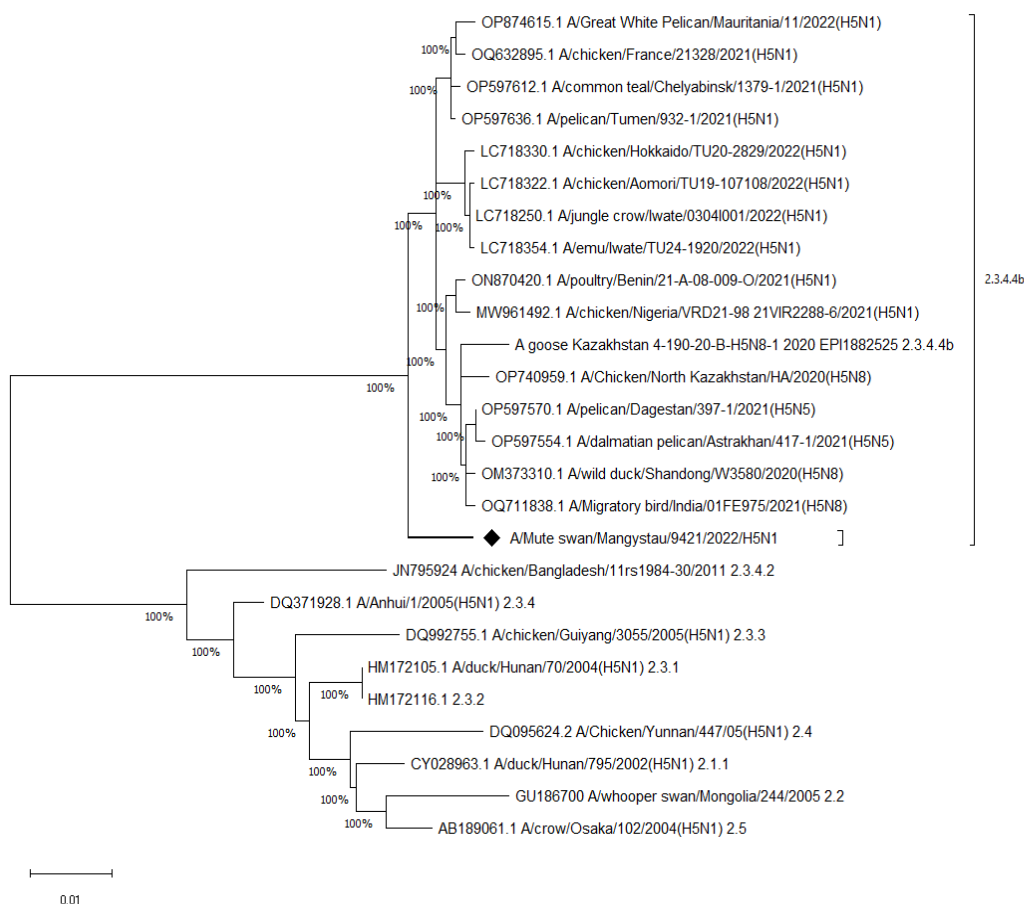


Figure 1 - Phylogenetic topology of the HA gene of influenza virus A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1)

From the point of view of pathogenicity, the following influenza A virus genes and the proteins encoded by them are of interest: HA, M2, NS1, and PB1-F2 [25].

The ability of HA to recognize host cell receptors is related to the structure of the receptor-binding site [26]. In the HA protein of the studied strain, a replacement of the amino acid residue at position 156 of Thr with Ala was revealed, which might lead to increased binding to sialic acid receptors (α 2,6-SA) [27].

The virulence of strains of influenza viruses is also associated with structural features of the NS protein. Two products of its post-translational cleavage, NS1 and NS2 proteins, are involved in the regulation of numerous aspects of the influenza virus life cycle and may affect their pathogenic properties [28]. Amino acid substitutions were found in the NS1 protein of the studied strain A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 - the substitution of Pro for Ser at position 42 and Val for Ala at position 149 in the NS1 protein are associated with virulence and pathogenicity in mice. An NS1 mutation such as Pro42Ser has also been found to modulate the virulence of H5N1 viruses [29].

The A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 isolate contained a substitution of Ala for Lys at position 184 of the NP protein, which increases the replication and pathogenicity of H5N1 [30].

The detection of amino acid residues in the NP protein as Leu at position 136, isoleucine at position 109, and Val at position 33 indicate avian-like viruses, while the detection of Met, Val, and Ile at the same positions indicate human-like viruses [31]. The studied isolate contained Leu136, Ile109 and Val33, i.e. amino acid residues similar to those of birds.

Phylogenetic analysis of the NA protein of the studied strain A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 displayed a close relationship with the viruses identified in Bangladesh and Japan (Figure 2).

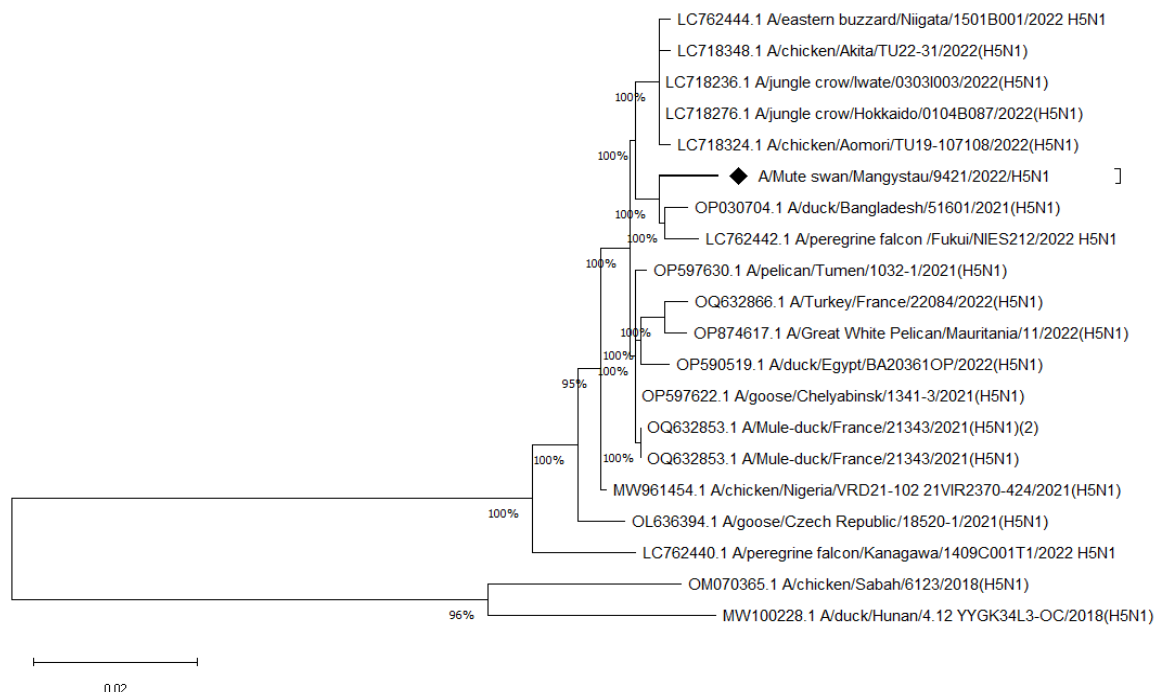


Figure 2 - Phylogenetic tree of the NA gene of A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) and other viruses circulating around the world.

The amino acid substitution Lys389Arg in the PB2 protein increases the polymerase activity in mammalian cells [32, 33], and this substitution was revealed as a result of genome sequencing of the studied H5N1 strain.

Amino acid substitutions for Leu89Val, Gly309Asp, Thr339Lys, Arg477Gly, Ile495Val, and Lys627Glu were noted in the A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 isolate. These substitutions in PB2, combined with changes in M1 and HA proteins, have been described to increase polymerase activity and virulence in mice [34].

Unique substitutions of amino acid residues in several proteins have been identified: HA - Asn3Lys and Ala511Ser; NA, Glu287Gly, Gln308His, Val394Ile, Ala395Glu, and Ser442Ile; M2 - Gln164Leu; NS1 - Ala76Thr, Ile81Asp and Val85Pro.

Conclusion

The studies demonstrated that the isolate, A/Mute swan/Mangystau/9421/2022 (H5N1) belongs to HPAI H5 clade 2.3.4.4b. The complete nucleotide sequences of all eight segments of the genome of this strain were determined. Analysis of the nucleotide sequence of the HA and NA gene of the H5N1 influenza virus showed the identity of 98.65% A/chicken/Nigeria/VRD21-37_21VIR2288-2/2021(H5N1) and 98.85% A/goose/Chelyabinsk/1341-3/2021(H5N1) respectively. Significant changes in the virus genome have been identified, such as amino acid substitutions in the HA Thr156Ala protein (resulting in increased virus binding to host cell receptors), NS Pro42Ser and Val149Ala (modulating the virulence and pathogenicity of H5N1 viruses), NP Ala184Lys (increasing H5N1 virus replication), which are due to the pathogenicity of this strain. A number of molecular markers have been identified in the A/H5N1 virus genome,

indicating a high pathogenicity of the strain for birds of the order chickens and mammals, and no mutations facilitating human infection have been detected.

Funding

The work was carried out within the framework of the project AP0925899 "Molecular evolution and ecology of influenza A viruses circulating among wild birds in Kazakhstan and revealing of a novel subtype" carried out under the Grant Funding Agreement for scientific and (or) scientific and technical projects for 2021-2023 (Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan).

References:

- 1 Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res*, 2018; 46: D708-D717. (doi: 10.1093/nar/gkx932)
- 2 Fereidouni S., Starick E., Karamendin K., Di Genova C., D. Scott S., Khan Y., Harder T. and Kydyrmanov A. Genetic characterization of a new candidate hemagglutinin subtype (H19) of influenza A viruses. *Emerging Microbes & Infections*, 2023; (doi: 10.1080/22221751.2023.2225645).
- 3 Wu Ying, Wu Yan, Tefsen B., Shi Y., Gao G.F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology*, 2014; 22(4): 183–191. (doi: 10.1016/j.tim.2014.01.010.52)
- 4 AbuBakar U., Amrani L., Kamarulzaman F.A., Karsani S.A., Hassandarvish P., Khairat J.E. Avian Influenza Virus Tropism in Humans. *Viruses*, 2023; 15, 833. (doi: 10.3390/v15040833)
- 5 Donis R. O. and G. J. Smith. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013–2014. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2014; 9 (5): 271-6. (doi: 10.1111/irv.12324)
- 6 Zhou X., Gao L., Wang Y., Li Y., Zhang Y., Shen C., Liu A., Yu Q., Zhang W., Pekin A., Guo F., Smith C., Clements A.C.A., Edwards J., Huang B., Soares Magalhães R.J. Geographical variation in the risk of H7N9 human infections in China: implications for risk-based surveillance. *Sci Rep.*, 2020; 10(1): 10372. (doi: 10.1038/s41598-020-66359-1)
- 7 Lewis N.S., Banyard A.C., Whittard E., Karibayev T., Al Kafagi T., Chvala I., Byrne A., Meruyert A., King J., Harder T., Grund C., Essen S., Reid S.M., Brouwer A., Zinyakov N.G., Tegzhanov A., Irza V., Pohlmann A., Beer M., Fouchier R.A.M., Akhmetzhan A.S, Brown I.H. 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: 148–151. (doi: 10.1080/22221751)
- 8 Cha R.M., Lee Y-N., Park M-J., Baek Y-G., Shin J-I., Jung C.H., Sagong M., Heo G-B., Kang Y-M., Lee K-N., et al. Genetic Characterization and Pathogenesis of H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Virus Isolated in South Korea during 2021–2022. *Viruses*, 2023; 15(6):1403. (doi: 10.3390/v15061403)
- 9 Baikara B.T., Saduakassova M.A., Karabasova A.S., Zhusupbekov Zh.S., Sultanov A.A. Epizootologicheskij monitoring grippa domashnej pticy. *Vestnik KazNU. Seriya biologicheskaya*, 2021; 3(88): 79-86. (doi: 10.26577/eb.2021.v88.i3.08)
- 10 World Health Organization. Communicable disease surveillance and response (CSR): Avian influenza. Available: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/. Accessed 19 August 2005.
- 11 Amirgazin A., Shevtsov A., Karibayev T., Berdikulov M., Kozhakhmetova T., Syzdykova L., Ramankulov Y., Shustov A.V. Highly pathogenic avian influenza virus of the A/H5N8 subtype, clade 2.3.4.4b, caused outbreaks in Kazakhstan in 2020. *PeerJ*, 2022; 10: e13038. (doi: 10.7717/peerj.13038)
- 12 WHO/CDS/CSR/NCS/ Manual for on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Geneva, 2002.–P. 15-18.
- 13 Office International des Epizooties (OIE), Manual of standards for diagnostic tests and vaccines.– Paris, 2000
- 14 Reed L., Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints // *J. Amer. Hyg.*, 1938; 2: 493-497. (doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408)
- 15 Kydyrmanov A., Sayatov M., Karamendin K., Zhumatov K., Asanova S., Daulbayeva K., Starick E., Fereidouni S. Monitoring of influenza A viruses in wild bird populations in Kazakhstan in 2002-2009. *Arch Virol.*, 2017; Jan;162(1):147-155. (doi: 10.1007/s00705-016-3076-4)
- 16 Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol.*, 2001; 146: 2275–2289. (doi: 10.1007/s007050170002)

- 17 Li O.T.W., Barr I., Leung C.Y.H., Chen H., Guan Y., et al. Reliable universal RT-PCR assays for studying influenza polymerase subunit gene sequences from all 16 hemagglutinin subtypes. *J Virol Methods*, 2007; 142: 218-222. (doi: 10.1016/j.jviromet.2007.01.015.)
- 18 Obenauer J.C., Denson J., Mehta P.K., Su X., Mukatira S., et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*, 2006; 311: 1576 – 1580. (doi: 10.1126/science.1121586.)
- 19 Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 1993; 10: 512–526. (doi: 10.1093/oxfordjournals .molbev.a040023)
- 20 Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016; 33: 1870–1874. (doi: 10.1093/molbev/msw054)
- 21 Brookes S.M., Mansfield K.L., Reid S.M., Coward V., Warren C., Seekings J., Brough T., Gray D., Núñez A., Brown I.H. Incursion of H5N8 high pathogenicity avian influenza virus (HPAIV) into gamebirds in England. *Epidemiol Infect*, 2022; 150: e51. (doi:10.1017/S0950268821002740)
- 22 Luczo J.M., Stambas J., Durr P.A., Michalski W.P., Bingham J. Molecular pathogenesis of H5 highly pathogenic avian influenza: the role of the haemagglutinin cleavage site motif. *Rev Med Virol*, 2015; 25(6): 406–430. (doi: 10.1002/rmv.1846)
- 23 Russell C.J. Hemagglutinin Stability and Its Impact on Influenza A Virus Infectivity, Pathogenicity, and Transmissibility in Avians, Mice, Swine, Seals, Ferrets, and Humans. *Viruses*, 2021; 13, 746. (doi: 10.3390/v13050746)
- 24 Baikara B., Seidallina A., Baimakhanova B., Kasymbekov Y., Sabyrzhan T., Daulbaeva K., Nuralibekov S., Khan Y., Karamendin K., Sultanov A., Kydyrmanov A. Genome Sequence of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/Chicken/North Kazakhstan/184/2020(H5N8). *Microbiology Resource Announcements*, 2023; 12: 6 (doi: 10.1128/mra.01151-22)
- 25 Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol.*, 1999; 73(2): 1146-55. (doi: 10.1128/JVI.73.2.1146-1155.1999.)
- 26 Weis, W., Brown, J., Cusack, S. *et al.* Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 1988; **333**: 426–431. (doi: 10.1038/333426a0)
- 27 Linster M., van Boheemen S., de Graaf M., Schrauwen E.J.A., Lexmond P., Mänz B., Bestebroer T.M., Baumann J., van Riel D., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E., Matrosovich M., Fouchier R.A.M., Herfst S. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell*, 2014; 10; 157(2): 329-339. (doi: 10.1016/j.cell.2014.02.040)
- 28 Li Z., Jiang Y., Jiao P., Wang A., Zhao F., Tian G., Wang X., Yu K., Bu Z., Chen H. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol*, 2006; 80: 11115–11123 (doi: 10.1128/JVI.00993-06)
- 29 Jackson D., Hossain M.J., Hickman D., Perez D.R., Lamb R.A. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci*, 2008; 105(11): 4381–4386. (doi: 10.1073/pnas.0800482105.)
- 30 Wasilenko J. L., Sarmiento L., Pantin-Jackwood M. J. A single substitution in amino acid 184 of the NP protein alters the replication and pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in chickens. *Arch Virol*, 2009; 154, 969–979 (doi: 10.1007/s00705-009-0399-4)
- 31 Chen G. W., Chang S. C., Mok C. K., Lo Y. L., Kung Y. N., Huang J. H., Shih Y. H., Wang J. Y., Chiang C. et al. Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12, 1353–1360 (doi: 10.3201/eid1209.060276)
- 32 Yamayoshi S., Yamada S., Fukuyama S., et al. Virulence-affecting amino acid changes in the PA protein of H7N9 influenza A viruses. *J Virol*, 2014; 88: 3127–3134. (doi: 10.1128/JVI.03155-13.)
- 33 Yamayoshi S., Kiso M., Yasuhara A., et al. Enhanced replication of highly pathogenic influenza A(H7N9) virus in humans. *Emerg Infect Dis*, 2018; 24: 746–750. (doi: 10.3201/eid2404.171509.)
- 34 Alkie T.N., Cox S., Embury-Hyatt C., Stevens B., Pople N., Pybus M.J., Xu W., Hisanaga T., Suderman M., Koziuk J., Kruczkiewicz P., Nguyen H.H., Fisher M., Lung O., Erdelyan C.N.G, Hochman O., Ojkic D., Yason C., Bravo-Araya M., Bourque L., Bollinger T.K., Soos C., Giacinti J., Provencher J., Ogilvie S., Clark A., MacPhee R., Parsons G.J., Eaglesome H., Gilbert S., Saboraki K., Davis R., Jerao A., Ginn M., Jones M.E.B., Berhane Y. Characterization of neurotropic HPAI H5N1 viruses with novel genome constellations and mammalian adaptive mutations in free-living mesocarnivores in Canada. *Emerg Microbes Infect*, 2023; 12(1): 2186608. (doi: 10.1080/22221751.2023.2186608.)