

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

о выполнении 5 этапа
Государственного контракта
№ 16.740.11.0179 от 02
сентября 2010 г.

- **Исполнитель:** Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный университет»

Программа (мероприятие): Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.2.1
Проведение научных исследований научными группами под руководством докторов наук.

Проект: Оценка пандемического потенциала вновь выделенных высоко патогенных вирусов гриппа H5N1-субтипа с использованием морфологических и молекулярно-биологических методов

Руководитель проекта: Шестопалова Лидия Владимировна

Цель и методы

- **Цель работы** - Оценка пандемического потенциала вновь выделенных высоко патогенных вирусов гриппа H5N1-субтипа с использованием морфологических и молекулярно-биологических методов.
- **Использованные методы** - светооптический, электронно-микроскопический , молекулярно-биологический анализ .

Результаты

1. Светооптическое изучение и ультраструктурный анализ тканевых и субклеточных структур органов экспериментально зараженных модельных животных

В структуре деструктивных изменений в легких превалировали апоптотически-измененные альвеолоциты, что связано с повреждением альвеолярного эпителия за счет прямого цитолитического эффекта вирусной инфекции.

Помимо кровоизлияний в легких мышей, инфицированных рекомбинантными штаммами вируса гриппа А H5N1 в динамике заболевания отмечали нарастание деструктивных изменений (участков некроза, апоптоза, а также ателектазов и острой эмфиземы), как следствие нарушения гемодинамики и трофики стенки сосудов.

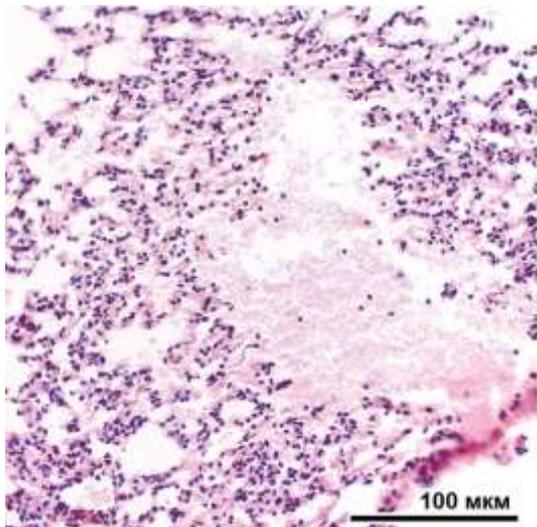


Рисунок 1. Патологические изменения респираторной ткани легких после заражения вирусом гриппа H5N1. Крупное кровоизлияние в альвеолы через 4 дня после заражения штаммом A/Goose/Krasnoozerskoye/627/05. Окраска гематоксилином и эозином.

Результаты

Таким образом, повреждение обоих типов пневмоцитов (альвеолоцитов) способствует образованию и накоплению отечной жидкости внутри альвеол, что, вместе со всеми деструктивными осложнениями, может иметь серьезные последствия для функции газообмена в респираторном тракте в виде нарастающей гипоксии.

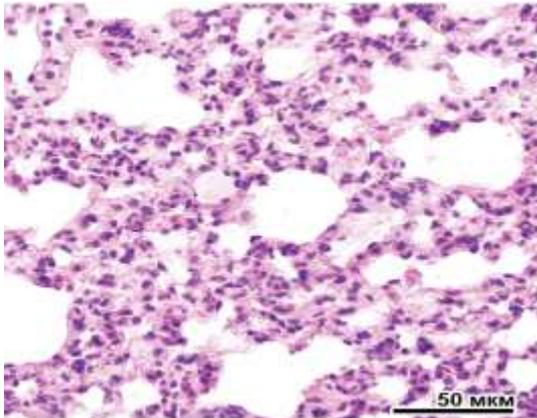


Рисунок 2. Патологические изменения респираторной ткани легких после заражения вирусом гриппа H5N1. Воспалительно-клеточная инфильтрация межальвеолярных перегородок через 6 суток после заражения штаммом A/great_crested_grebe/Tyva/22/2010. Окраска гематоксилином и эозином.

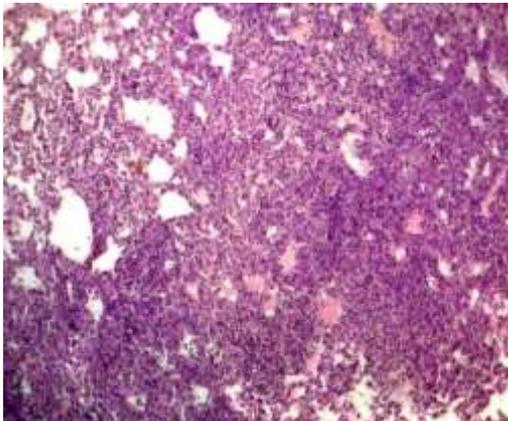


Рисунок 3. Патологические изменения респираторной ткани легких после заражения вирусом гриппа H5N1. Интенсивная воспалительно-клеточная инфильтрация межальвеолярных перегородок через 6 суток после заражения штаммом A/Goose/Krasnoozerskoye/627/05. Окраска гематоксилином и эозином.

Результаты

Исследование тканей легких **под электронным микроскопом** уже через сутки после заражения мышей линии BALB/с рекомбинантными штаммами вируса гриппа А/Н5N1 выявило появление вируса в альвеолярном эпителии, эндотелии легочных капилляров и просвете альвеолярных мешков. Встречаются вирионы овальной и цилиндрической формы, а также незрелые вирусные частицы, представляющие собой капсиды. Наличие вироплазмы в ядрах и цитоплазме клеток, а также отпочковывающиеся вирионы свидетельствуют о репродукции вируса в тканях легких – альвеолоцитах и эндотелиальных клетках уже на начальных стадиях заболевания.



Рисунок 4. Фрагмент альвеолоцита легкого мыши, инфицированной вирусом гриппа птиц субтипа Н5N1 *A/goose/Krasnoozerskoye/627/05*. **1 сутки** после заражения. Электроннограмма. Увеличение x45700.

Результаты

Таким образом, изменения в клетках легких мышей линии BALB/с инфицированных рекомбинантными штаммами вируса гриппа *A/H5N1* имели однотипный характер.



Рисунок 5. Фрагмент альвеолярной перегородки легкого мыши, инфицированной вирусом гриппа птиц субтипа H5N1 *A/goose/Krasnoozerskoye/627/05*. **3 суток** после заражения. Видны вироплазма, образующиеся нуклеокапсиды, отпочковывающиеся от поверхности альвеолоцита вирионы. В участках повреждения цитоплазматической оболочки видны зрелые вирусные частицы. Электроннограмма. Увеличение x68200.

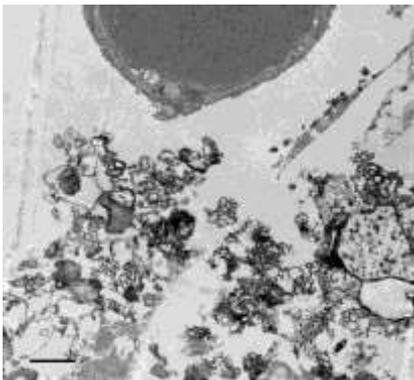


Рисунок 6. Фрагмент альвеолоцита легкого мыши, инфицированной рекомбинантным штаммом вируса гриппа птиц субтипа H5N1 *A/goose/Krasnoozerskoye/627/05*. **6 суток** после заражения. Видны разрушения клетки. Электроннограмма. Увеличение x45700

Результаты

2. Вирусологическое исследование материала собранного при экспериментальной инфекции модельных животных

Для вирусологического исследования рекомбинантных вирусов, полученных на предыдущем этапе был использован метод TCID₅₀ (50% инфекционная доза на культуре клеток) так же был проверен IVPI индекс.

Название рекомбинантного вируса	Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	IVPI
A/common gull/Chany/P/2006 (оригинальный вирус)	5.5±0.2	1.7
1-ч	7.6±0.3	2.68
2-ч	6.5±0.2	2.30
3-ч	6.2±0.2	2.35
4-ч	5.8±0.3	2.50
5-ч	7.3±0.1	2.86
6-ч	6.1±0.2	2.53
7-ч	5.9±0.2	2.60
8-ч	6.3±0.3	2.60
9-ч	6.5±0.1	2.42
A/Goose/Krasnoozerskoye/627/05 (оригинальный вирус)	8.3±0.1	3.0
1-к	5.6±0.1	2.32
2-к	6.2±0.1	2.80
3-к	6.7±0.2	2.57
4-к	7.2±0.1	2.85
5-к	5.8±0.2	2.44
6-к	6.1±0.2	2.44
7-к	7.2±0.3	2.56
8-к	6.5±0.1	2.72
9-к	5.9±0.3	2.62
A/great_crested_grebe/Tyva/22/2010 (оригинальный вирус)	7.5±0.3	3.0
1-г	5.8±0.1	2.30
2-г	6.1±0.1	2.55
3-г	6.7±0.3	2.86
4-г	6.3±0.1	2.45
5-г	5.9±0.2	2.41
6-г	7.2±0.1	2.65

Как видно из таблицы, внесение точечных замен, характерных для высокопатогенных вирусов гриппа A/great_crested_grebe/Tyva/22/2010 и A/Goose/Krasnoozerskoye/627/05 в геном A/common gull/Chany/P/2006 вызвали увеличение индекса IVPI и значения log₁₀ TCID₅₀/ml. При этом наибольшее увеличение значений этих тестов вызвала комбинация всех внесенных мутаций (вирус 1ч) и аминокислотные замены в позициях 205 для HA и 456, 667 в PB2 (вирус 5ч). Для высокопатогенных вирусов гриппа внесение в выбранные позиции аминокислот, характерных для A/common gull/Chany/P/2006 вызвало незначительное уменьшение значений log₁₀ TCID₅₀/ml, но сильно повлияло на значение индекса IVPI. Самое значительное уменьшение значения индекса IVPI характерно для тех же позиций что и в случае с вирусами 1ч и 5ч.

Результаты

3. Молекулярно-биологическое исследование материала собранного при экспериментальной инфекции модельных животных

Была проведена постановка ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени на амплификаторе IQCycler (BioRad, США) для выявления вируса гриппа типа А в образцах органов экспериментально зараженных животных.

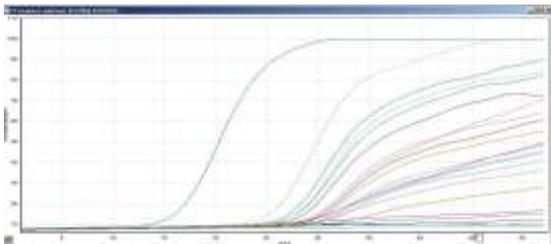


Рисунок 7. Показаны результаты Real-time PCR для рекомбинантных вирусов полученных на основе A/common gull/Chany/P/2006

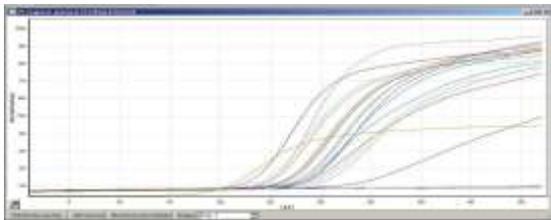


Рисунок 8. Показаны результаты Real-time PCR для рекомбинантных вирусов полученных на основе A/Goose/Krasnoozerskoye/627/05.

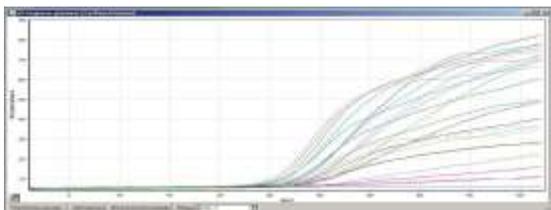


Рисунок 9. Показаны результаты Real-time PCR для рекомбинантных вирусов полученных на основе A/great_crested_grebe/Tyva/22/2010.

Результаты

4. Сравнительный анализ данных о патогенезе гриппозной инфекции, вызванной рекомбинантными штаммами вируса гриппа с различными биологическими свойствами

Внесение точечных замен, характерных для высокопатогенных вирусов гриппа A/great_crested_grebe/Tyva/22/2010 и A/Goose/Krasnoozerskoye/627/05 в геном A/common gull/Chany/P/2006 вызвали увеличение численной плотности альвеолоцитов в состоянии деструкции. При этом наибольшее увеличение значений этих тестов вызвала комбинация всех внесенных мутаций (вирус 1ч) и аминокислотные замены в позициях 205 для HA и 456, 667 в PB2 (вирус 5ч). Для высокопатогенных вирусов гриппа внесение в выбранные позиции аминокислот, характерных для A/common gull/Chany/P/2006 вызвало незначительное уменьшение значений \log_{10} TCID₅₀/ml, но сильно повлияло на значение индекса IVPI. Самое значительное уменьшение значения индекса IVPI характерно для тех же позиций что и в случае с вирусами 1ч и 5ч.

Следует отметить высокую тропность вируса гриппа A/H5N1 к альвеолоцитам и легких мышей линии BALB/c, что показано во всех экспериментальных группах. Цитотоксичность вируса гриппа A/H5N1 детерминируют цепь последовательно развивающихся патологических структурных изменений: деструкцию сосудов, увеличение их проницаемости, тромбоэмболические и геморрагические осложнения, масштабные интерстициальный и внутриальвеолярный отек, десквамацию альвеолярного эпителия с развитием очагов ателектазов и диффузной острой эмфиземы, создающих патогенетические условия для острой гипоксии – фактора риска усиления процессов деструкции вне прямой связи с цитопатичностью вируса.

ПУБЛИКАЦИИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЙ

Показатели летальности при экспериментальной и естественной инфекции, вызванной высокопатогенным вирусом гриппа H5N1.	Статья	Зайковская А.В., Леонов С.А., Юшков Ю.Г., Рассадкин Ю.Н., Шестопалов А.М.	Бюл. ВСНЦ СО РАМН, 2012, №5 (87), ч.1, стр.224-227.	В работе представлены описательные данные показателей летальности при экспериментальной и естественной инфекции разных видов домашней птицы. показателей летальности при естественной инфекции были определены в период эпизоотии гриппа в новосибирской области и июле 2005 года на частных подворьях. Для экспериментального инфицирования домашних видов птиц (гусей, уток и кур 2 кроссов) был использован штамм вируса гриппа A/goose/krasnoozerskoye/627/05 (H5N1).
Экология вируса гриппа в популяциях диких птиц Центральной Азии	Статья	Марченко В.Ю., Шаршов К.А., Шестопалов А.М.	Бюл. ВСНЦ СО РАМН, 2012, №5 (87), ч.1, стр.271-275.	Представлены результаты мониторинга вируса гриппа А среди диких птиц Центральной Азии в 2003-2009гг. Было исследовано 2604 образца от диких птиц. На территории Казахстана было собрано 279 проб от диких птиц, 650 было собрано на территории Монголии (13 изолятов) и России (4 изолята). В результате вирусологического анализа было показано, что 6 изолятов относятся к H3N6 субтипам вируса гриппа, 5 к H4N6. А также было выделено 2 вируса гриппа H1N1 субтипа, H10N7, H3N8 и новый для Центральной Азии H13N8 субтип вируса гриппа А.
Экология вируса гриппа у чаек Дальнего Востока России.	Статья	Сайфутдинова С.Г., Шаршов К.А., Герасимов Ю.Н., Шестопалов А.М.	Бюл. ВСНЦ СО РАМН, 2012, №5 (87), ч.1, стр.316-318.	Было проведено исследование, направленное на изучение роли птиц сем. Чайковые в распространении вируса гриппа А. В ходе выполненной работы был проведен сбор полевого материала от диких птиц на территории Дальнего Востока. Было выделено 14 изолятов вируса гриппа А четырех различных субтипов. Что подтверждает роль чаек как природного резервуара для вирусов гриппа.
Уникальные варианты вируса гриппа у птиц Юга Западной Сибири	Статья	Сивай М.В., Юрлов А.К., Друзьяка А.В., Шаршов К.А., Шестопалов А.М.	Бюл. ВСНЦ СО РАМН, 2012, №5 (87), ч.1, стр.319-322.	В ходе мониторинга вируса гриппа на территории России в 2008 году был выделен уникальный штамм вируса A/teal/Chany/7119/2008 H15N4 субтипа. Ранее все вирусы гриппа H15 были выделены только на территории Австралии в 1979 и 1983гг. Был проведен генетический и антигенный анализ данного штамма, в ходе которого были показаны антигенные отличия исследуемого вируса и референс-штамма A/shearwater/Australia/ 2376/1979. Результаты проведенного исследования указывают на необходимость проведения дальнейших проведения мониторинговых работ за вирусом гриппа птиц с целью изучения вновь возникающих вариантов вируса, генетического разнообразия патогена, его эволюции и экологии.
Экология и эволюция высокопатогенного вируса гриппа H5N1 в России (2005-2012гг).	Обзор литературы	Шаршов К.А., Марченко В.Ю., Юрлов А.К., Шестопалов А.М.	Бюл. ВСНЦ СО РАМН, 2012, №5 (87), ч.1, стр.393-396.	В статье содержится подробный сравнительный анализ вирусологических, молекулярно-биологических и патогенетических характеристик вирусов H5N1-субтипа, изолированных в России.
Выделение вируса гриппа H5 субтипа у гусей при	Статья	Зайковская А.В., Романовская А.А., Шаршов	Ветеринария, 2012, №5, с.30-32	В работе представлены данные о выделении вируса гриппа у гусей после экспериментального инфицирования штаммами вируса гриппа H5 субтипа различными по степени

Участие в международных и всероссийских конференциях

Авторы	Название работы	Название конференции и место проведения	Форма доклада
Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.	Циркуляция вирусов гриппа среди морских млекопитающих	“Морские млекопитающие Голарктики 7Суздаль, участие в Научной конференции с международным участием”. Суздаль, 23-29 сентября 2012 г.☐	доклад
Шаршов К.А., Марченко В.Ю., Юрлов А.К., Шестопалов А.М.	Экология и эволюция высокопатогенного вируса гриппа H5N1 в России (2005-2012гг).	«Фундаментальные и прикладные аспекты инфекционной патологии», посвященная 100-летию института эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСРЧ СО РАМН , Иркутск, 27-28 сентября 2012 г	доклад
Shestopalov A.M., Sharshov K.A., Marchenko V.Y., Susloparov I.M., Aleksseev A.Y., Silko N.Y., Durymanov A.G.	H5N1 virus in Russia (2005-2011): molecular epidemiology, ecology and evolution.	«The 3rd International Influenza Meeting 2012» Munster, Germany, 2-4 September, P. 170.	постер
Prokopena E.A., Sayfutdinova S.G., Ilyicheva T.N., Shestopalova L.V., Shestopalov A.M.	Comparative analysis of some biological properties of influenza A(H1N1)pdm09 virus strains isolated in Russia in 2009 and 2011.	«The 3rd International Influenza Meeting 2012» Munster, Germany, 2-4 September, P. 82.	постер
Sobolev I., Kurskaya O., Durymanov A., Ilyicheva T., Shestopalov A.	Investigation of Circulation of the Influenza Virus in the Human Population in Western Siberia in 2011-2012.	Incidence, Severity, and Impact: an isirv International Conference on Seasonal and Pandemic Influenza. Munich, Germany, 5-8 September 2012.	постер
Sivay M., Sharshov K., Marchenko V., Yurlov A., Druzyaka A., Shestopalov A..	Surveillance for Avian Influenza Viruses in the Western Siberia (Russia), 2008-2011.	“Influenza 2012: One Influenza, One world”, 11-13 September, Oxford, UK.	доклад

Участие в международных школах-конференциях

Участники	Название школы-конференции	Дата и место проведения школы-конференции / Количество участников	Председатель организационного комитета
Прокопьева Е.А., Соболев И.А., Сивай М.В., Шаршов К.А., Шестопапов А.М.	"Эпидемиология, эпизоотология, оперативная диагностика инфекций, переносимых дикими птицами"	21-24 августа 2012 г., г. Новосибирск, Россия. 28 чел.	д.б.н., проф. Шестопапов А. М.
Сайфутдинова С.Г.	Advanced Training Course for Zoonosis Control (ATCZC) 2012.	Duration (tentative) : the beginning of August, 2012 – the end of November, 2012. Training Institutes: Graduate School of Veterinary Medicine Graduate School of Medicine Research Center for Zoonosis Control Institute for Genetic Medicine (at Hokkaido University Sapporo, Japan) Принимают участие 8 человек.	Program Leader KIDA, Hiroshi, DVM, PhD, MJA

ОБОБЩЕНИЕ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе данной работы:

1. Проведена аналитическая работа по систематизации литературных данных об известных маркерах патогенности вируса гриппа А субтипа H5N1; собраны и выявлены новые опубликованные источники литературы.
2. Создана база данных опубликованных источников, содержащая аннотированные справки по каждому типу опубликованных источников научной литературы за период выполнения работ.
3. Проведено изучение патогенеза гриппозной инфекции.
4. В экспериментальных условиях было проведено инфицирование животных рекомбинантными штаммами вируса гриппа H5N1.
5. Проведено светооптическое изучение и ультраструктурный анализ ткани легкого у экспериментально зараженных модельных животных.
6. Проведено вирусологическое исследование материала собранного при экспериментальной инфекции модельных животных.
7. Проведено молекулярно-биологическое исследование материала собранного при экспериментальной инфекции модельных животных.
8. Проведен сравнительный анализ данных о патогенезе гриппозной инфекции, вызванной рекомбинантными штаммами вируса гриппа с различными биологическими свойствами.

ОБОБЩЕНИЕ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

9. Разработана рекомендация по использованию полученных фундаментальных знаний о молекулярных детерминантах патогенности вируса гриппа с целью создания препаратов, воздействующих на данные детерминанты и использовании их в медицине.
10. Разработаны технологии моделирования гриппозной инфекции у млекопитающих и птиц, позволяющие изучать роль факторов естественной неспецифической резистентности макроорганизма в патогенезе данного заболевания, осуществлять скрининг эффективности различных средств и способов её коррекции с целью лечения и профилактики этого заболевания.
11. Разработаны две специализированные научно-образовательные программы для курсов: «Патогенез гриппозной инфекции» и «Молекулярные маркеры патогенности вируса гриппа».

Полученные данные легли в основу публикаций в ведущих российских и международных журналах и были представлены на российских и международных конференциях. Данная работа выполнена на высоком уровне.