

**Федеральное бюджетное учреждение науки
государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»**

На правах рукописи

Прокопьева Елена Александровна

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА А(Н1N1)pdm09 ПРИ
АДАПТАЦИИ К МЫШАМ РАЗЛИЧНОГО ГЕНОТИПА**

03.02.02 - вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель

доктор биологических наук, профессор

Шестопалов А.М.

Санкт-Петербург

2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | стр. |
|--|------------|
| ВВЕДЕНИЕ | 3 |
| ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ..... | 12 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 12 |
| 1.1 Общие данные о гриппе..... | 12 |
| 1.2 Эпидемии и пандемии..... | 23 |
| 1.4 Выбор и обоснование оптимальных экспериментальных моделей и условий для изучения патогенеза гриппозной инфекции и адаптации пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09..... | 47 |
| 1.5 Изучение адаптации вируса гриппа A(H1N1)pdm09..... | 51 |
| 1.6 Заключение по обзору литературы..... | 53 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 55 |
| ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ | 71 |
| 3.1 Изучение адаптации пандемического вируса гриппа..... | 71 |
| 3.2 Изучение биологических свойств штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших во время пандемии 2009 г. и в постпандемический период в 2011 г. на территории Сибири | 101 |
| 3.3 Сравнительное исследование патогенности вирусов гриппа A/H5N1 и A(H1N1)pdm09 (неадаптированный и адаптированный варианты) | 116 |
| ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ | 127 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 143 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 144 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 148 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ | 179 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Вирус гриппа А (ВГА) имеет широкий круг хозяев, включающий различные виды млекопитающих и птиц (Webster et al., 1992). Ежегодные эпидемии и случайные пандемии унесли миллионы людских жизней. Благодаря ВГ А(H1N1)pdm09 мир стал свидетелем первой пандемической инфекции XXI века. Данный вирус гриппа возник в 2009 году в виде эпизоотии среди свиней в Мексике и вскоре быстро распространился среди людей, был зарегистрирован более чем в 214 странах и стал результатом около 151,700 – 575,400 смертей по всему миру (WHO, 2010a; WHO, 2010b; Dawood et al., 2012). Пристальное внимание к данному вирусу обусловлено опасностью возникновения катастрофической гриппозной пандемии, сравнимой с «Испанским гриппом» H1N1 1918 года, унесшего жизни 0,2%-8% инфицированных людей из различных стран (около 50 млн. людей по всему миру) (Taubenberger and Morens, 2009). Вирус гриппа А(H1N1)pdm09 охарактеризован высокой степенью трансмиссии, однако до сих пор остаются сравнительно низкими его вирулентные и летальные свойства. Однако известен ряд более тяжёлых и смертельных случаев инфицирования вирусом А(H1N1)pdm09, при которых отмечали схожие симптомы заболевания с высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1, такие как пневмония и острый респираторный дистресс-синдром (Garigliany et al., 2010).

Молекулярные механизмы, с помощью которых пандемический вирус гриппа 2009 года смог преодолеть межвидовой барьер от свиней к людям, затем адаптироваться в популяции человека и приобрести высоко контагиозные свойства, до сих пор остаются неизвестными. Однако, лабораторно доказано, что вирус гриппа А(H1N1)pdm09 легко адаптируется к мышам при последовательном пассировании в лёгких, вызывая у последней экспериментальной группы 100% летальность (Rolling et al., 2009; Ilyushina et al., 2010; Sakabe et al., 2011; Xu et al., 2011; Imai et al., 2012). Эти исследования позволяют предсказать вероятную картину развития событий в условии 100% адаптации вируса гриппа к той популяции, в которой он циркулирует при благоприятных для себя условиях.

Существует опасение, что если вирус гриппа А(H1N1)pdm09 сохранит способность эффективно передаваться от человека к человеку и при этом усилит свои вирулентные свойства, благодаря адаптации к человеку, то новый адаптированный вариант, возможно, будет обладать более значительным влиянием на здоровье населения планеты, что увеличит число смертельных исходов. Вирус гриппа А постоянно эволюционирует, и, не исключено, что в будущем появятся новые пандемичные варианты. Поэтому чрезвычайно важно проводить мониторинг данного патогена в популяции диких и домашних животных (птиц, млекопитающих), а также среди людей, заболевших ОРВИ, и изучать адаптацию вируса гриппа к восприимчивым хозяевам. Новые данные принесут не только фундаментальные знания, но и будут иметь важное прикладное значение как для ветеринарии, так и для медицины.

Таким образом, все вышеизложенное указывает на важность изучения биологических свойств ВГА H1N1 и H5N1 с пандемическим потенциалом. Результаты, полученные в ходе данной работы, помогут не только улучшить знания о патогенезе, но и об адаптации пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09.

Степень разработанности. Одной из актуальнейших проблем современной вирусологии является изучение адаптации вирусов к новым хозяевам (домашним и диким животным, человеку). Вирусная адаптация является важной приспособительной задачей, цели которой заключаются в подавлении или избегании противовирусного иммунитета хозяина. Известно, что вирусы гриппа А способны преодолевать межвидовой барьер и вызывать заболевания среди птиц, млекопитающих и людей (Webster et al., 1992). И потому данный патоген является удобной моделью для изучения круга хозяев и механизма преодоления межвидового барьера, поскольку его геном имеет фрагментарное строение, и вклад отдельных генов можно определить, используя метод реассортации или адаптации к различным экспериментальным животным (Киселев и Львов, 2012; Pyushina et al., 2010). Изучению механизмов вирусной адаптации и изменений вирулентности ранее непатогенных штаммов ВГ на мышинной модели посвящены

работы следующих авторов: О.И. Киселева, Д.К. Львова, Т. Rolling, N.A. Pyushina, M. Garigliany, L. Xu, S. Sakabe, K.J. McHugh. Целесообразность изучения патологических процессов в лёгких, происходящих при адаптации ВГ к мышам, является адекватным методическим подходом, поскольку изменения, возникающие в лёгких мышей, сходны с патоморфологическими изменениями при вирусных пневмониях у человека (Sweet and Smith, 1980).

Используемый нами прототип (штамм *A/Tomsk/273/2009(H1N1pdm09)* (*Tomsk/2010*) был выделен в 2010 году во второй половине пандемии от человека, исход заболевания гриппом у которого был благополучным, и впоследствии адаптирован к лабораторным животным. В результате были получены три адаптированных варианта к генетически различным мышам: *A/Tomsk/273-MA1/2010(H1N1pdm09)* (*MA-BALB/c*) - к мышам линии BALB/c, *A/Tomsk/273-MA2/2010(H1N1pdm09)* (*MA-C57BL/6z*) - к мышам линии C57Bl/6z, *A/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09)* (*MA-CD1*) - к аутбредным мышам CD1. Существуют аналоги близкие к нашим адаптированным вариантам. Это штамм *A/Russia/01-ma/09(H1N1)* и штамм *A/IV-Anadyr/177-ma/2009(H1N1)pdm09*, которые также изначально были выделены из человеческого организма, а затем адаптированы к лабораторным животным. Основное отличие аналогов от нашего прототипа в том, что изначально они были выделены в более ранний период пандемии - в 2009 году, при этом из гомогенатов умерших людей на территории РФ. Учитывая значительную изменчивость вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших в конце пандемического периода и достаточно различающихся по молекулярно-генетическим характеристикам от вариантов, циркулировавших в более ранний период пандемии, установлено, что сравниваемые штаммы аналогов качественно отличаются по геномному составу от нашего прототипа. В настоящий момент во всем мире широко распространились и продолжают циркулировать штаммы пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, закрепившие в своём геноме нуклеотидные последовательности характерные для конца пандемического периода 2010 года (<http://www.euroflu.org/index.php>). Известно, что в эпидемиологическом сезоне

2013-2014 гг. среди сезонных вирусов гриппа доминировал A(H1N1)pdm09 (Лабораторная диагностика, Global).

В настоящий момент существует ограниченное количество работ, посвященных изучению роли домашних и диких животных, в том числе птиц, при возникновении высоковирулентных ВГА, обладающих эпизоотическим и пандемическим потенциалом. И потому сохраняется необходимость создания, изучения и использования актуальных вариантов пандемических штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 для проверки эффективности современных противогриппозных препаратов *in vivo* и *in vitro*, имеющих важное значение в эпидемиологической и клинической практике.

Цель исследования: оценка фено- и генотипа пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 при его адаптации к мышам.

Задачи исследования:

1. Получить высоковирулентные варианты вируса гриппа типа А, используя пандемический штамм *Tomsk/2010*, для инбредных мышей линии BALB/c и линии C57Bl/6z, а также для аутбредных мышей CD1 путём последовательных слепых пассажей через лёгкие.
2. Провести анализ изменения биологических свойств полученных высоковирулентных вариантов вируса гриппа типа А в процессе проводимой адаптации к мышам с помощью вирусологических и молекулярно-биологических методов.
3. Изучить репликацию неадаптированного и адаптированного вариантов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в органах (мозг, печень, почка, тонкая кишка) у экспериментально инфицированных мышей линии BALB/c в динамике заболевания с помощью вирусологических и морфологических методов.
4. Изучить биологические свойства неадаптированного и адаптированного вариантов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к мышам в сравнении с высокопатогенным вирусом гриппа А/Н5N1, используя вирусологические и морфологические методы.

Научная новизна. Были получены три адаптированных штамма пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к мышам различных генотипов: линии BALB/c, линии C57Bl/6z и аутбредным мышам CD1. Показано усиление вирулентных свойств пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 при последовательном пассировании через лёгкие мышей, вне зависимости от генотипа животных. Показано, что пандемический вирус гриппа A(H1N1)pdm09 способен быстро адаптироваться к генетически различным лабораторным мышам, вызывая летальность до 100% благодаря селекционному накоплению аминокислотных замен в геноме. Получены полные геномные последовательности трёх адаптированных вариантов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Результаты секвенирования геномов депонированы в международный банк (GenBank). Проанализированы данные о роли отдельных сегментов генома вируса гриппа в повышении вирулентности при адаптации в лёгких экспериментально инфицированных мышей. Анализ первичной структуры всех белков пандемического ВГ неадаптированного варианта (штамм *Tomsk/2010*) и трех адаптированных вариантов (штамм *MA-BALB/c*, *MA-C57BL/6z* и *MA-CD1*) выявил 19 аминокислотных замен в шести белках (НА, NA, NP, NS2, PB2, PB1) и наличие потенциальной экспрессии факультативного неструктурного белка PB1-F2 у адаптированных вариантов вируса. Наиболее генетически близкими являются штамм *MA-BALB/c* и штамм *MA-C57BL/6z*. Обнаружен ряд одинаковых аминокислотных замен отвечающих за усиление патогенности штаммов *MA-BALB/c*, *MA-C57BL/6z* и *MA-CD1* во время адаптации к экспериментальным животным: в белке PB2 (S317L; T271A; R482K; T689A; I690V), в белке PA (295P), в белке NA (E172G, G239D), в белке NP(N375D), в белке NA (I357V; L443I; T467I), в белке NS2 (M235V, A236V). Доказана персистенция адаптированного варианта вируса гриппа в головном мозге, печени и почке у инфицированных мышей линии BALB/c. Показано наличие вирусных частиц в области гемато-ликворного барьера головного мозга. Полученные данные были также подтверждены с помощью электронной микроскопии.

Теоретическая и практическая значимость. Из прототипного штамма *Tomsk/2010* были получены три адаптированных варианта к генетически различным мышам: *MA-BALB/c* - к мышам линии BALB/c, *MA-C57BL/6z* - к мышам линии C57Bl/6z, *MA-CD1* - к аутбредным мышам CD1. Определены полные геномные последовательности всех вариантов пандемического ВГ A(H1N1)pdm09, а также изучены их вирулентные свойства и влияния на структуры внутренних органов (лёгкое, головной мозг, печень, почка и тонкая кишка). Из штаммов *MA-BALB/c*, *MA-C57BL/6z* и *MA-CD1* создана панель пандемических штаммов ВГ A(H1N1)pdm09 с оценкой действия противовирусных химиопрепаратов. Полученный в ходе выполнения работы адаптированный вариант вируса гриппа A(H1N1)pdm09 штамм A/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09) использовали в доклиническом исследовании специфической противовирусной активности окисленных декстранов "Исследование профилактической эффективности окисленных декстранов с молекулярной массой 40 кДа (декстраналь 40, диальдегид декстран 40, ОД - 40) и 70 кДа (декстраналь 70, диальдегид декстран 70, ОД - 70) при интраназальном введении на модели гриппа у мышей", производимых в АО «ФНПЦ «Алтай» г. Бийск. С использованием адаптированного штамма *MA-CD1* A(H1N1)pdm09 было показано, что окисленные декстраны снижают смертность экспериментального гриппа у мышей до 60% в зависимости от молекулярной массы окисленного декстрана. Адаптированные варианты пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, полученные в ходе данной работы, могут быть использованы в вирусологических исследованиях для моделирования летальной гриппозной инфекции с целью изучения биологических свойств пандемического вируса гриппа типа А.

Методология и методы исследования. В работе использованы классические вирусологические методы (выделение вируса в культуре клеток MDCK и его наработка; инфицирование мышей; определение TCID₅₀, ЛД₅₀), серологические методы (РГА, РТГА, МН); молекулярно-биологические методы (выделение РНК, постановка ПЦР real time; гель-электрофорез, секвенирование;

анализ генома вируса гриппа), а также методы морфофункционального анализа (световая и электронная микроскопия; иммуногистохимический анализ). Более подробно способы проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы».

Основные научные положения, выносимые на защиту:

1. Пандемический ВГ А(Н1N1)pdm09 способен быстро адаптироваться к генетически различным животным, вызывая 100% летальность благодаря селекционному накоплению аминокислотных замен в геноме. Высоковирулентные свойства адаптированных штаммов отличаются при перекрёстном инфицировании лабораторных мышей различных генотипов.

2. Неадаптированный вариант пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *Tomsk/2010*) не вызывает летального заболевания у экспериментально заражённых мышей в отличие от адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *MA-BALB/c*) и высокопатогенного ВГ А/Н5N1 (штамм *Krasn/05*), под воздействием которых у экспериментально инфицированных мышей линии BALB/c регистрируется репликация вируса в лёгких, головном мозге, печени и почке.

3. Наличие у адаптированных вариантов пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (*MA-BALB/c*, *MA-C57Bl/6z*, *MA-CD1*) одинаковых аминокислотных замен в шести белках (PB2: *S317L*; *T271A*; *R482K*; *T689A*; *I690V*; PA: *295P*; HA: *E172G*, *G239D*; NP: *N375D*; NA: *I357V*; *L443I*; *T467I*; NS2: *M235V*, *A236V*) в комплексе с потенциальной экспрессией факультативного неструктурного белка PB1-F2 определяет их высоковирулентные свойства на модели млекопитающих.

Личное участие. Работа выполнена соискателем самостоятельно, участие соавторов отражено в совместно изданных научных статьях.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов исследований, проведённых автором, подтверждена адекватным

статистическим анализом данных, полученных в ходе независимых экспериментов. Материалы диссертации доложены и обсуждены на: 12th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (Bangkok, 2014); 7th annual CEIRS Surveillance meeting (Memphis, 2013 г.), международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (г. Санкт-Петербург, 2013 г.), III ежегодной конференции специалистов по работе с лабораторными животными (г. Новосибирск, 2013), the 3rd International Influenza Meeting (Munster, 2012 г.), конференции молодых специалистов «Грипп: Эпидемиология, вирусология, профилактика и лечение» (г. Санкт-Петербург, 2012 г.), международной молодежной научной школе "Эпидемиология, эпизоотология, оперативная диагностика инфекций, переносимых дикими птицами (г. Новосибирск, 2012 г.), Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions (Hongkong, 2011 г.), The fourth ES WI influenza (Malta, 2011 г.), конкурсе молодых ученых и специалистов на соискание премии им. Н.К. Кольцова (п. Кольцово, 2011 г.).

Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 18 работ, в том числе 3 статьи – в российских журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ («Bulletin of Experimental Biology and Medicine», «Вестник Новосибирского государственного университета»), 1 патент.

Внедрение результатов исследований. Из прототипного штамма *Tomsk/2010* получена коллекция адаптированных вариантов ВГ к мышинной модели млекопитающих: *MA-BALB/c* — к мышам линии BALB/c, *MA-C57BL/6z* — к мышам линии C57BL/6z, *MA-CD1* — к аутбредным мышам CD1. Все варианты пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 депонированы в Музей вирусов гриппа и ОРЗ» в ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ (г. Санкт-Петербург).

Получены первичные структуры всех белков штаммов: *Tomsk/2010*, *MA-BALB/c*, *MA-C57BL/6z* и *MA-CD1*, которые депонированы в международной базе данных GenBank.

Полученный в результате адаптации к аутобребным мышам CD1 штамм *MA-CD1* использовали в лаборатории экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний и лабораторией структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний в рамках выполнения основной темы НИР "Исследование молекулярно-клеточных основ патогенеза новых и наиболее распространенных на территории Сибири инфекционных заболеваний вирусной этиологии для разработки средств их специфической профилактики" номер государственной регистрации 0121353865. Кроме того, штамм *MA-CD1* использовали в доклиническом исследовании специфической активности окисленных декстранов "Исследование профилактической эффективности окисленных декстранов с молекулярной массой 40 кДа (декстраналь 40, диальдегид декстран 40, ОД - 40) и 70 кДа (декстраналь 70, диальдегид декстран 70, ОД - 70) при интраназальном введении на модели гриппа у мышей".

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 183 страницах машинописного текста, включает список использованной литературы, введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов собственных исследований, выводы, практические приложения, список литературы и приложение.

Диссертация иллюстрирована 12 таблицами и 26 рисунками. Список литературы включает 260 источника, в том числе 198 работ зарубежных авторов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие данные о гриппе

Грипп – это высококонтагиозная острая респираторная вирусная инфекция, передающаяся, как правило, воздушно-капельным путём от заболевшего лица, но иногда инфицирование происходит при контакте с контаминированными вирусом предметами. Вирусы гриппа могут оставаться жизнеспособными на жёстких непористых поверхностях в течение 24 ч, на тканях до 15 минут, на руках в течение 5 мин и более 48 ч на денежных купюрах (Bean et al., 1982; Tomas et al., 2008).

Обычно грипп характеризуется воспалением респираторного тракта в сочетании с лихорадкой, ознобом, болью в мышцах и слабостью. Последствия данного заболевания для здоровья человека могут быть как незначительными, так и смертельными в зависимости от вирулентности штамма вируса и наличия факторов риска, к которым относятся возраст, сопутствующие заболевания и генетические особенности больного. В настоящий момент грипп остается неуправляемой вирусной инфекцией, наносящей существенный ущерб здоровью населения и экономике стран во всем мире. Неконтролируемость и низкая предсказуемость возникновения гриппозной инфекции связаны с необыкновенной мутационной изменчивостью вируса в естественных условиях. По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) гриппом ежегодно в мире болеют до 500 миллионов человек (от 5 до 30% населения земного шара), среди которых отмечаются 3-5 млн. тяжелых случаев и от 250 000 до 500 000 летальных исходов, а экономический ущерб составляет от 1 до 6 млн долл. на 100 тыс. человек (ВОЗ, 2005(a); Arias et al., 2009). Непрерывная циркуляция вируса гриппа, постоянная мутация его генома и высокая контагиозность приводит к появлению

вирусов с новыми свойствами, против которых у восприимчивых пупуляций нет иммунитета. По этой причине возникают зоонозы, эпидемии и пандемии, вызванные вирусом гриппа А (Карпухин и Карпухина, 2000; Карпухин, 2001; Киселев, 2010).

Эпидемиологические особенности вирусов гриппа А, В и С. Вирус гриппа принадлежит к семейству *Orthomyxoviridae*, состоящему из шести родов – *Influenza virus A*, *Influenza virus B*, *Influenza virus C*, *Isavirus*, *Quarantavirus* и *Togotavirus*, которые отличаются по антигенным особенностям матриксного белка (*matrix protein, M1*) и нуклеопротеина (*nucleoprotein, NP*), не дают межтиповых перекрёстных реакций, и кроме того различаются по ряду эколого-эпидемиологических и структурных признаков (Щелканов и Львов, 2011; ICTV, 2012).

Первые три рода (типа) вируса гриппа сокращенно обозначают - А, В и С. Вирус гриппа типа С (*influenza C virus, FLUCV*) выделяемый, главным образом, от людей, чаще встречается у детей. Новые данные показали, что данный тип вируса гриппа (ВГ) может быть выделен от крупного рогатого скота и свиней (Hause et al., 2014). В человеческой популяции вирус гриппа С (ВГС) не вызывает эпидемий, а только локальные вспышки в детских заведениях. Обычно заболевание дыхательных путей протекает спорадически и бессимптомно или в очень легкой форме (Щелканов и др., 2011). Геном всех типов вируса гриппа представлен линейной негативной фрагментированной РНК, при этом у гриппа типа С он состоит из 7 генов, а у типов А и В - из 8-ми генов (Cox and Subbarao, 2000; Jagger et al., 2012). Антигенная структура вируса гриппа типа С является стабильной и не подвержена таким изменениям как у вируса типов А и В.

Вирус типа В (*influenza B virus, FLUBV*), по литературным данным, выделялся только от человека и тюленей (Osterhaus et al., 2000; Bodewes et al., 2013). Предполагается, что именно тюлени являются природным резервуаром вируса гриппа типа В (Щелканов и др., 2011). Инфекция, вызванная данным типом, может развить серьезное респираторное заболевание, особенно среди детей

младшего школьного возраста (ВОЗ, 2009; Вирус гриппа А/Н5N1: атлас патологических изменений внутренних органов домашней птицы, 2009).

Вирус гриппа А (ВГА; *influenza A virus, FLUAV*) имеет наибольшую эпизоотическую, эпидемическую и пандемическую значимость, поскольку имеет такие характеристики, которые делают его наиболее опасным среди известных на сегодняшний день агентов инфекционных заболеваний. У ВГА отсутствует механизм защиты считывания генома, поэтому в процессе репродукции возникают небольшие ошибки сделанные РНК-зависимой РНК-полимеразой (*RNA-dependent RNA-polymerase, RdRp*) и они остаются незамеченными и неисправленными. ВГА мутирует значительно быстрее, чем вирус типа В, что обуславливает большую степень его варибельности и приспособляемости (Вирус гриппа А/Н5N1: атлас патологических изменений внутренних органов домашней птицы, 2009).

В основе эпизоотологии, эпидемиологии и пандемии гриппозной инфекции лежат эпитопные перестройки, определяющие антигенную формулу штаммов. Это изменения структуры поверхностных белков вируса гриппа - гемагглютинина (hemagglutinin, HA) и нейраминидазы (neuraminidase, NA), которые возникают в результате антигенного дрейфа или антигенного шифта. Наиболее часто с геномом вируса гриппа происходят точечные мутации преимущественно в генах поверхностных белков (HA и NA) в процессе репликации. Такой процесс называется антигенным дрейфом, суть которого заключается в накоплении незначительных мутаций, что позволяет популяции вируса гриппа избегать иммунного ответа со стороны восприимчивого хозяина. Второй генетический механизм - антигенный шифт – усиливает варибельность генома ВГА за счет полной смены антигенного профиля молекул и появлению новых субтипов вируса (Львов и др., 2006; Murphy and Webster, 1996). Такой вариант событий происходит во время одновременного инфицирования одной клетки более чем одним вирусом (коинфекция). Однако во время коинфекции может произойти обмен между генами не только поверхностных, но и внутренних белков путем кроссинговера или копирования фрагментов (Lamb and Krug, 2001). Этот процесс называется

генетической рекомбинацией (реассортация) и может быть осуществлен в том числе и в лабораторных условиях с помощью метода обратной генетики. В результате появляются вирусы с новым набором генов. С иммунологической точки зрения такая тактика позволяет вирусу сохраняться продолжительное время, поскольку у восприимчивой популяции нет против него иммунитета (WHO, 2007).

Молекулярно-генетическая характеристика вируса гриппа А. Вирусные частицы (*вирионы*) имеют сферическую или плеоморфную форму диаметром 80-120 нм. Кроме того, известно, что вирионы могут иметь нитевидную форму, достигая в длину до 30 мкм (Chu, Dawson and Elford, 1949; Itoh et al., 2009; Seladi-Schulman, Steel and Lowen, 2013). Структура вириона образована сердцевинной, состоящей из нуклеокапсида, окружённого липидным бислоем клеточного происхождения, на поверхности которого находятся три белка: гемагглютинин, нейраминидаза и интегральный мембранный белок (*membrane protein, M2*), образующий ионный канал, крайне важный для развития инфекционного процесса. Нуклеокапсид упакован в оболочку из белка M1 и представлен сегментированным геномом. Каждый из восьми сегментов имеет винтовую симметрию и представлен рибонуклеопротеиновым комплексом (*Ribonucleoprotein, RNP*), который образован однонитчатой линейной РНК (*single-stranded RNA, ssRNA*), нуклеокапсидным белком (*nucleocapsid protein, NP*) и тремя полимеразными полипептидами, образующие RdRp (Рисунок 1). РНК-зависимая РНК-полимераза представляет собой мультифункциональный комплекс, имеющий в составе от трех до 5-ти белков: PB1, PB1-F2, NP40, PB2 и PA. Восемь сегментов генома в зависимости от патогенности ВГА кодируют до 12 белков (Таблица 1) (Львов и др., 2006; Pinto et al., 1992; Webster et al, 1992; Shaw and Palese, 2008; Virus Taxonomy, 2011).

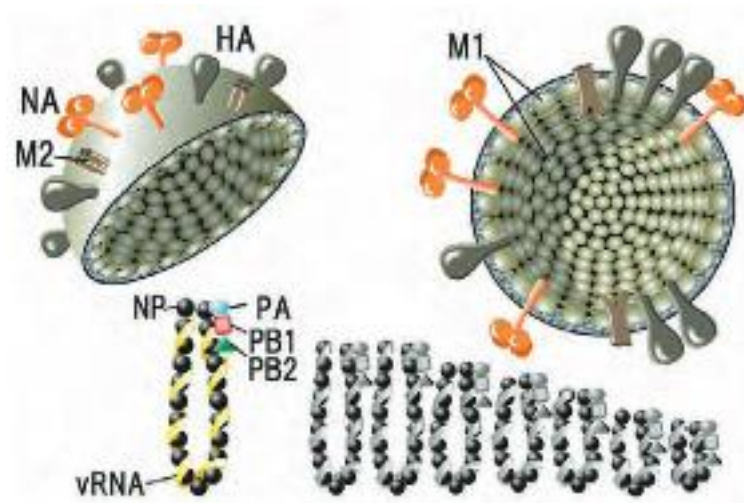


Рисунок 1 - Диаграмма вириона вируса гриппа А в проекции
(Virus Taxonomy, 2011)

Наиболее существенный вклад в патогенность ВГА вносят белки HA, PB1, PB1-F2, PB2, NS1. Устойчивость вирусов к противовирусным препаратам определяется двумя белками – NA и M2 (Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012).

Таблица 1. Современные представления о функциях белков

вируса гриппа А.

| Принятый номер сегмента ¹ | Кодируемые белковые продукты (молекулярная масса в кД) ² | Основные функции белков | Литература |
|--------------------------------------|---|--|---|
| 1 | PB2 (84,0) (кэп-РНК-эндонуклеаза) | Белок полимеразного комплекса, ответственный за репликацию vRNA. Отщепляет кэп-фрагменты от хозяйских mRNA | Webster et al., 1992; Lamb and Krug, 1996; Virus Taxonomy, 2011 |
| | PB1 (87,0) | Белок полимеразного комплекса участвует в синтезе mRNA, выполняя функцию транскриптазы | |
| 2 | PB1-F2 | Является факультативным неструктурным белком и обнаруживается не у всех ВГА. Играет роль в увеличении патогенности. Вызывает апоптоз клеток-хозяина, способен разрушать альвеолярные макрофаги. Также опосредованно регулирует полимеразную активность, находясь в комплексе с белком PB1, и влияет на иммунный ответ | Hale et al., 2010; Varga and Paleze, 2011; Tauber et al., 2011 |
| | PB1 N40 | Факультативный неструктурный белок. Он связывается с RdRp ВГА, способствуя ускорению репликации вируса в культуре клеток | |
| 3 | PA (83,0) | Входит в состав полимеразного комплекса, участвует в синтезе vRNA (инициация транскрипции), выполняя функцию эндонуклеазы. Индуцирует протеолитические процессы, снижающие уровень накопления собственного белка и коэкспрессируемых белков | Webster et al., 1992; Lamb and Krug, 1996; Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012 |
| | PA-X (29,0) | Его экспрессия в клетках-хозяина снижает патогенность вируса гриппа. Низкая экспрессия данного белка полностью изменяет кинетику ответа хозяина, в том числе увеличивается воспалительные процессы и апоптозы. | |
| 4 | HA1 (48,0) | Связывание с рецепторами на поверхности клетки-хозяина; слияние мембраны вирусной частицы с эндосомальной мембраной; основной антиген вируса, вызывающий иммунный ответ, стимулирует экспорт вирусного генома к месту сборки вируса. Обладает агглютинирующим свойством с эритроцитами многих видов млекопитающих и птиц. Патогенность ВГА определяется концевой последовательностью HA1, содержащей несколько основных аминокислот, мишень вируснейтрализующих антител. HA2 осуществляет связь с липидной мембраной и участвует в упаковке вирусного генома | Weis et al., 1990; Lamb and Krug, 1996; Киселев и др., 2005, Virus Taxonomy, 2011 |
| | HA2 (29,0) | | |

¹Согласно последней номенклатуре сегментов генома ВГА (М.Ю. Щелканов и др., 2011)²Истинные значения молекулярной массы после посттрансляционных модификаций, если таковые имеются.

продолжение таблицы 1- Современные представления о функциях белков вируса гриппа А.

| Принятый номер сегмента ³ | Кодируемые белковые продукты (молекулярная масса в кД) ⁴ | Основные функции белков | Литература |
|--------------------------------------|---|---|---|
| 5 | NP (56,0) | Участвует в образовании RNP. Связан с сегментами vRNA и RdRp. Обеспечивает транспорт vRNA в ядро и из ядра клетки к месту сборки вириона за счёт последовательности ядерной аккумуляции. Обладает антигенным свойством | Weis et al., 1990 |
| 6 | NA (50,0) | Выполняет функцию фермента, разрушающего рецепторы: удаляет сиаловую кислоту от НА, расщепляя гликозидную связь; высвобождает вирионы с поверхности клеток-хозяев, что способствует распространению вируса в организме. Мишень вируснейтрализующих антител | Lamb and Krug, 2001 |
| 7 | M1 (28,0) | С внутренней стороны выстилает липидную оболочку, обеспечивая ее структурную стабильность за счет связи с цитоплазматическими доменами НА и NA, обладает антигенным свойством. В большом количестве накапливается в ядрах инфицированных клеток и участвует в экспорте RNP вирусного потомства из ядра в цитоплазму, контролирует транскрипцию vRNA | Lamb et al., 1981; Virus Taxonomy, 2011; Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012 |
| | M2 (11,0) | Образует ионные каналы в мембране вириона, регулирует pH. Низкие значения pH необходимы для раздевания вируса и стабилизации конформации НА во время его внутриклеточного транспорта. Вызывает гемолиз эритроцитов при низком значении pH, чувствителен к препаратам амантадинового ряда | |
| 8 | NS1 (27,0) | Является неструктурным белком. Не обнаруживается в вирионе, а присутствует только в инфицированных вирусом клетках. Препятствует экспорту клеточных mRNA из ядра и противовирусному действию интерферонов, обладает антигенным свойством | Garcia-Sastre et al., 1998; Lamb and Krug, 2001; Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012 |
| | NS2 (NEP) (14,0) (белок ядерного экспорта) | Связан с белком M1, отвечает за экспорт RNP из ядра в цитоплазму клетки-хозяина | |

³Согласно последней номенклатуре сегментов генома ВГА (М.Ю. Щелканов и др., 2011)

⁴Истинные значения молекулярной массы после посттрансляционных модификаций, если таковые имеются.

Новые шифт-варианты ВГА возникают сравнительно редко (Murphy and Webster, 1985). За последние два века было зарегистрировано только три шифта по гемагглютинуину (Н1, Н2, Н3) и два по нейраминидазе (N1, N2) (Webster et al., 1992; Neumann et al., 2009). Источником новых шифт-вариантов могут быть животные, прежде всего дикие и домашние птицы. Их вирусы нередко сочетают оригинальные гемагглютинины с нейраминидазами вирусов гриппа млекопитающих или людей, что позволяет предполагать возможность происхождения новых субтипов на основе генетических пересортировок между штаммами разной природы (Murphy and Webster, 1996). Генофонд ВГА наиболее часто пополняется за счет выноса эпидемических вирусов в популяцию восприимчивых животных с дальнейшей персистенцией новых штаммов или их отдельных генов в природных биоценозах (Львов и Жданов, 1982).

Быстрая смена поколений у животных создает идеальные условия для возникновения *реассортантов* (генетических *рекомбинаций*) с самыми различными поверхностными и внутренними антигенами, поскольку менее выраженное, как в человеческих коллективах, давление популяционного иммунитета способствует длительному сохранению вирусов и/или их отдельных генов в различных экологических нишах. Именно фрагментарное строение вирусного генома определяет его экологическую пластичность, персистенцию в различных экосистемах и расширение круга хозяев (Львов и др., 2004).

Природноочаговый характер вируса гриппа А. По последним литературным данным, субтипы ВГА классифицируются в соответствии с комбинацией антигенов (специфических белков на поверхности вируса) на 18 субтипов - по гемагглютинуину и на 11 субтипов - по нейраминидазе (Каверин и Львов, 2008; Kawaoka Y. et al., 1990; Tong et al., 2012; Tong et al., 2013). Циркуляция 1-16 субтипов НА и 1-9 субтипов NA поддерживается среди птиц водно-околоводного экологического комплекса, к которым в первую очередь относится подсемейство речных (*Anatinae*) и нырковых (*Aythiinae*) уток, а также семейство утиных (*Anatidae*), чайковых (*Laridae*) и крачковых (*Sternidae*). Все они служат бесконечным и постоянным источником распространения и гигантским

резервуаром для генетических изменений вируса (Щелканов и др., 2011; Koehler et al., 2008; Shi et al., 2010). Интересно отметить, что за последние 2 года были выделены от летучих мышей два новых субтипа, не известных ранее – это H17N10 и H18N11 (Tong et al., 2012, Tong et al., 2013), что говорит о существовании новых мало изученных резервуаров вируса гриппа.

В настоящее время существуют 4 научных концепции поддержания циркуляции вируса гриппа А в биосфере: 1) антропозоонозная (доминировавшая ранее, но опровергнутая впоследствии теория о том, что человек является резервуаром ВГА), 2) зооантропонозная (основная современная гипотеза утверждающая, что ВГА циркулирует в популяциях диких птиц водно-околоводного комплекса), 3) метастронгилезная (паразитические нематоды как резервуар и промежуточный хозяин), 4) протозойная (дополнительный механизм циркуляции ВГА в протозоях и гидробионтах) (Щелканов и др., 2011).

Важную и до конца не известную роль в сохранении и распространении вируса гриппа играет и среда обитания основного резервуара гриппа – птицы. Высокая концентрация ВГА с фекалиями диких водоплавающих птиц выделяется в местах естественных обитаний и сохраняется в холодной воде и/или в донных отложениях во время холодного сезона. При температуре воды в 22 °С вирус способен сохраняться до месяца, а при +4 °С и ниже – более продолжительное время (до 6-8 месяцев) (Львов и др., 2006). На жизнеспособность ВГА в природной воде (в пресной, слабо минерализованной и в морской) отрицательно влияет увеличение солености и увеличение рН выше нейтрального значения (ВОЗ, 2006). Поэтому водно-фекальный путь инфицирования считается основным механизмом поддержания постоянства циркуляции вируса гриппа в природе. Инфекция у диких перелетных птиц протекает, как правило, бессимптомно или в виде энтерита, длящегося 20-30 дней (Львов и др. 2006). Учитывая способность птиц покрывать в день расстояние до 300 км, легко представить масштабы распространения вируса гриппа в различные регионы РФ и другие страны мира.

В последнее время появилась новая гипотеза об адсорбции вируса на

поверхности перьев водоплавающих птиц и сохранении инфицирующих свойств патогена благодаря жировому покрытию оперенья. В настоящее время изучается механизм предварительной концентрации ВГА на телах птиц, с потенциальной возможностью передачи и заражения в процессе чистки оперения. (Delogu et al., 2010).

Инфекция гриппа у людей имеет сезонный характер, который зависит от многих факторов: географического положения определенного района, климата, переносчиков и восприимчивых хозяев. Обычно эпидемии возникают зимой (с января по апрель) в Северном полушарии и летом (с мая по сентябрь) в Южном полушарии. Заболеваемость гриппом и ОРВИ у людей, проживающих в Северном полушарии, в осенне-зимний период объясняется скученностью населения в закрытых помещениях с низкой влажностью и слабым проветриванием (Сморозинцев, 1984). А в районе экватора вирусы выделяются в течение всего года, достигая одного или двух пиков во время дождливых сезонов (Gendon, 1991; Monto, 2008).

С сезонным эффектом распространения вируса гриппа также связывают миграционные перелеты, которые проходят в две волны - весенне-летнюю и летне-осеннюю, а также возраст диких водоплавающих птиц. Молодые особи диких птиц, не имеющие ещё иммунитета против гриппозной инфекции, встают осенью на крыло и, будучи инфицированными, совершают длительные перелёты, распространяя патоген на большие расстояния (Webster et al., 2006; van Dijk et al., 2014).

ВГА попадает в различные экологические группы птиц, млекопитающих, в том числе в популяцию человека путём прямого или опосредованного инфицирования. Прямой путь инфицирования происходит при непосредственном заражении человека от источника инфекции - диких перелётных птиц или кур (Suarez et al., 1998; Subbarao et al., 1998). Ранее считалось, что вирусы гриппа птиц не патогенны для людей, однако события в Гонконге в 1997, 2003 и в последующих годах доказали обратное, когда были зарегистрированы случаи инфицирования человека от кур ВГА субтипом H5N1. Летальность в 1997 году

составила 6 человек из 18 заболевших, в 2003 - 2 человека из 5, а за период с 2003 по 2014 гг. - 386 из 650 подтвержденных случаев инфицирования людей по всему миру по состоянию на 11 марта 2014 года (WHO, 2014). При этом особо следует подчеркнуть во всех случаях отсутствие вирусной передачи от человека к человеку. Основываясь на вирулентности штаммов при экспериментальном инфицировании кур вирусы гриппа птиц принято подразделять на низко патогенные (НПВГП; *low pathogenic avian influenza viruses, LPAIV*) и высокопатогенные (ВПВГП; *highly pathogenic avian influenza viruses, HPAIV*) (Avian Influenza, 2008). LPAIV вызывают лишь незначительные или бессимптомные инфекции, тогда как HPAIV вызывают чрезвычайно тяжёлые клинические формы заболевания гриппом с высокой летальностью от 75% до 100% (Swayne, 2007). Данная классификация определяется наличием нескольких основных аминокислот в сайте расщепления гемагглютинина у HPAIV, которые чаще встречаются среди подтипов H5 и H7 (Avian Influenza, 2008).

При опосредованном пути инфицирования человека предполагается, что промежуточным звеном, участвующим в формировании эпидемически активных вариантов, является свинья (Любовцева и Закстельская, 1984; Dacso et al., 1984; Rota et al., 1989; Brown et al., 1998). Случаи переноса вирусов гриппа в популяцию свиней были отмечены в 1970, 1996, 2004 и 2009 гг. (Shope, 1958; Hinshaw et al., 1978; Pensaert et al, 1981; Neumann et al, 2009). Отмечена доминирующая циркуляция таких подтипов как H1N1, H1N2, H3N1, H3N2, часто называемых в литературе “свиными” вирусами гриппа (ВОЗ, 2009(в); Hinshaw et al., 1978; Sugimura et al., 1980; Xie et al., 2014). Несмотря на то, что данные вирусы обычно являются видоспецифическими и инфицируют только свиней, они способны к межвидовой трансмиссии и инфицированию человека, как это наглядно показала последняя пандемия, вызванная четверным реассортантом вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009 году (Neumann et al, 2009).

Рецепторная специфичность вируса гриппа А. Основной рецепторной детерминантой всех вирусов гриппа А является сиаловая кислота. Природные

сиалозиды разделяются на два типа по связи сиаловой кислоты с галактозой. Принятое обозначение двух связей: сиалил(α 2-3)галактозная (Neu5Ac α 2-3Gal; SA α 2,3Gal) и сиалил(α 2-6)галактозная (Neu5Ac α 2-6Gal; SA α 2,6Gal) связь. Как правило, вирус гриппа птиц хорошо связывается с первым, а вирус гриппа человека – со вторым типом сиалозидов (Paulson, 1985; Connor, 1994; Ito et al., 1998). Главный участок репликации ВГА в организме диких водоплавающих птиц представлен эпителиальными клетками желудочно-кишечного тракта, на поверхности которых находятся SA α 2,3Gal рецепторы. Они также называются рецепторами *птичьего типа*, а SA α 2,6Gal – рецепторами *человеческого типа*. Последний тип рецептора преимущественно экспрессируется у человека на поверхности реснитчатых и щёточных клеток слизистой оболочки носа, придаточных пазух носа, глотки, трахеи, внелегочных бронхов, лёгочных бронхов и терминальных бронхиол. Также SA α 2,6Gal рецепторы диффузно представлены во всех альвеолярных клетках (альвеолоцитах I и II типов, альвеолярных макрофагах), но в малом количестве. По последним данным, птичий тип рецепторов тоже регистрируется в респираторной ткани человека. Однако редко обнаруживается на эпителиальных клетках щёточного типа верхних дыхательных путей, зато преобладает в нижнем отделе респираторного тракта – в альвеолах, а именно в альвеолоцитах II типа (Shinya et al., 2006; van Riel et al., 2006). Вероятно, за счёт такого распределения рецепторов высокопатогенный грипп птиц (ВПП) А/Н5N1, который преимущественно распознает SA α 2,3Gal рецепторы, в первую очередь инфицирует альвеолоциты II типа и макрофаги в лёгких человека (Shinya et al., 2006; Kuiken and Taubenberger, 2008). По литературным данным у свиней экспрессируются оба типа рецепторов в разном соотношении в лёгких, печени, почках, головном мозге, скелетных мышцах и кишечнике, что говорит о возможном участии жизненно важных органов в возникновении и развитии гриппозной инфекции (Nelli et al., 2010).

1.2 Эпидемии и пандемии

Благодаря постоянным изменениям своего генома вирус типа А обладает

уникальной особенностью ежегодно вызывать сезонные эпидемии гриппа среди людей, которые характеризуются высоким уровнем заболеваемости и значительным уровнем смертности (показатель смертности в разных странах 0,01 – 0,2 %), особенно в случаях, осложнённых вирусной пневмонией или вторичной бактериальной инфекцией. Кроме того, периодически, с неустановленным до сих пор интервалом ВГА вызывает пандемии, которые увеличивают общее количество заболеваемости и смертности по сравнению с межпандемическими периодами. Это происходит главным образом из-за отсутствия у популяции человека специфического иммунитета к новому вирусу (Wright, 2007). Грипп и его осложнения занимают первое место в структуре смертности от инфекционных и паразитарных заболеваний (наряду с туберкулезом и менингококковой инфекцией) (Синопальников и Белоцерковская, 2006). К настоящему моменту известны только три субтипа ВГА способные вызывать эпидемии и пандемии среди людей - это H1N1, H2N2 и H3N2 (Львов и др., 2006).

Эпидемии. Точные данные о заболеваемости и смертности от гриппа в основном поступают из промышленно развитых стран. Сезонный (эпидемический) грипп ежегодно отмечается во всем мире, и годовая глобальная пораженность составляет 5%–10% среди взрослого населения (ВОЗ, 2005). Тяжелая заболеваемость и смертность чаще всего встречаются среди людей пожилого возраста (старше 65 лет), где смертность достигает до 80-90% (11-81/100 000), а также среди людей страдающих заболеваниями сердца и лёгких, больных ВИЧ/СПИД (Lui and Kendal, 1987). Тогда как смертность пациентов 45-64 лет без сопутствующей патологии составляет менее 2/100 000 человек (Barker and Mullooly, 1982). К группе высокого риска относятся также беременные женщины, особенно в III триместре беременности, в связи с вероятным развитием таких осложнений, как рождение мертвого плода, смерть новорожденного, преждевременные роды, рождение ребенка малого веса (Omer, 2011).

Сезонным вирусом гриппа болеют в среднем 20%–30% детей, что

приблизительно в 4 раза чаще по сравнению со взрослыми. Пик инфицирования и заболеваемости у детей, по одним оценкам, наблюдается в возрасте 5-9 лет, по другим – в возрасте 7-14 лет (Синопальников и Белоцерковская, 2006; Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012). Особую группу составляют дети в возрасте до 2-х лет из-за частых летальных исходов (ВОЗ, 2005).

Во время эпидемий частота госпитализаций по поводу гриппа и его осложнений среди пациентов моложе 65 лет с одним и более сопутствующими заболеваниями составляет 56–63,5 случая на 100 000 человек, а у пациентов без сопутствующей патологии - 13–60/100 000 человек (Neuzil, 1999).

Сезонные подъёмы заболеваемости и смертности, превышающие ожидаемый уровень, часто используются в качестве меры оценки относительной серьезности эпидемий гриппа. По данным НИИ гриппа г. Санкт-Петербурга, в России ежегодно болеют гриппом и ОРВИ 26,6% населения городов, в том числе 84,6% детского населения и 14% лиц старше 15 лет (Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012).

Пандемии. Пандемии являются достаточно редкими, но повторяющимися событиями, которые распространяются по всему миру в течение 1 – 2 лет, с поражением всех возрастных групп населения и всех типов человеческих рас. У инфицированных людей часто наблюдаются тяжелые клинические формы заболевания и высокая смертность. Во время пандемий также отмечаются: вытеснение из циркуляции вируса-предшественника, волна-предшественник, отмечается высокий уровень заболеваемости, в 3 – 4 раза больше в сравнении с текущими эпидемиями, вероятно, из-за низкого уровня или отсутствия популяционного иммунитета против нового штамма (Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012).

История пандемий вируса гриппа. Впервые описание массовых заболеваний людей и клинической картины, получившей впоследствии название «грипп», встречается еще в трудах Гиппократ (460-450 гг. до н.э.). Были ли пандемии, вызванные вирусом гриппа, до 1510 г. до сих пор остается не

выясненным. Однако существуют некоторые признаки в записях, указывающие на пандемию еще в 876 г., которая началась в Италии и распространилась по всей Европе во время нашествия армии Карла Великого. Тогда же в записях исторических архивов, помимо людской смертности, был отмечен интересный факт - эпизоотия среди птиц и собак. Первые достоверные сведения об эпидемиях, вызванных вирусом гриппа, датируются 1510 г. (Таблица 2) (Taubenberger and Morens, 2009). В дальнейшем, судя по документальным источникам, обширные эпидемии и пандемии повторялись с периодичностью в 7 - 49 лет и, как правило, зарождались на Востоке. Сильнейшие пандемии гриппа произошли в XIX – XX вв. Они были обусловлены следующими вариантами вируса гриппа А: H1N1, H2N2, H3N2 и H1N1pdm09. Все, кроме ВГА 1918 года, были реассортантами: птица-человек, птица-свинья, птица-свинья-человек (Webster et al., 1992; Neumann et al., 2009). Считается, что вирус, вызвавший в марте 1918 года самую страшную пандемию, которая когда либо была на Земле - «Испанку», возник в результате эволюции и был птичьим вирусом гриппа (Taubenberger et al., 1997).

Таблица 2. История пандемий гриппа

| Год/ субтип ВГА | Источник | Время года | Область распространения | Характер пандемии | Литературный источник |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------------|---|--|---|
| 1510 | Африка | Лето | Европа, страны Балтики | Смертность была низкой и в основном среди детей младшего возраста | Taubenberger and Morens, 2009 |
| 1557-1558 | Азия | Весна | Европа | Высокая смертность в результате плевритов и пневмоний. Также регистрировались летальные случаи среди беременных | |
| 1580 | Азия | Лето | Европа, Африка, Северная Америка | Высокая смертность. Две обособленные волны: август-сентябрь и октябрь-ноябрь | Finkler, 1898 |
| 1729-1730 1732-1733 | Россия | Весна | Россия, Европа, Северная и Южная Америка | Впервые в истории распространение заболевания начиналось с территории России. Две обособленные волны (или две эпидемии); вторая – более тяжелая с расширением географии до Америки | Taubenberger and Morens, 2009 |
| 1761-1762 | Америка | Весна | Европа, глобальная пандемия | Данной пандемии предшествовала эпизоотия среди лошадей в 1775 г. | |
| 1780–1782 | Юго-Восточная Азия (Китай) | Осень | Китай, Россия, Европа, Индия, Северная Америка | Высокий уровень заболеваемости, но низкая смертность. Две волны; вторая – более тяжёлая | Morens and Fauci, 2007 |
| 1788-1790 | Азия | -- ⁵ | Азия, Европа | Некоторые авторы выделяют этот период в отдельную пандемию в промежутке между 1782 и 1806 гг. | Creighton, 1891 |
| 1830-1831 1832-1833 1836-1837 | Юго-Восточная Азия (Китай) | Зима | Китай, Россия, Европа, Северная Америка, Индия | “Две или три” последовательные пандемии. Последняя – более тяжёлая. Высокие темпы развития заболеваемости, низкая смертность | Leichtenstern, 1896 |
| 1847-1848 | Азия/Россия | Зима/ Весна | Азия, Россия, Европа, Северная Америка | Некоторые расхождения в исторических источниках: возможно, не истинная пандемия | Гендон, 2008; Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012; Taubenberger and Morens, 2009 |
| 1889-1893 H2N2 «Русский грипп» | Азия/Россия | Весна | Глобальная пандемия | Зародилась в г.Бухаре и по Великому шёлковому пути распространилась на территории России, а затем Европы. Массивное заражение весной и летом. Последние волны зимой более тяжёлые из-за коинфекции, вызванной бактерией <i>Haemophilus influenzae</i> . По некоторым источникам патоген относился к H3-субтипу по HA. Смертность составила около 6 млн.человек | |
| 1900 H3N8 «Гонконгский грипп» | Китай (г.Гонконг) | -- | Азия, Европа, Северная и Южная Америка, Австралия | Скудные клинические проявления; выделение нового подтипа вируса было определено серологическим методом путём ретроспективного анализа антител в сыворотках крови людей, живших в конце XIX — начале XX вв. Смертность - 2 млн.чел | Гендон, 2008 |

⁵ -- не определено

продолжение таблицы 2. История пандемий гриппа

| Год/ субтип ВГА | Источник | Время года | Область распространения | Характер пандемии | Литературный источник |
|---|-----------------------------------|-----------------------------|---|---|---|
| 1918 – 1920 H1N1 «Испанский грипп» («Испанка») | Китай/ США | Весна (март) | Глобальная пандемия | Смертность составила около 50 млн. человек по всему миру (летальность >2,5%). По некоторым оценкам от 50 до 100 млн.чел по всему миру. В течение первого года наблюдалось три волны (W-образных или три модальных). Первая волна произошла в марте-апреле, вторая – сентябре-ноябре заболеваемости с преимущественным поражением молодой здоровой части населения (около 25 млн.), средний возраст которых составил от 15 до 34 лет. Высокая смертность вызванная «Испанским гриппом», вероятно, была результатом коинфекции с бактериальной пневмонией. Доказано, что ВГ А(H1N1)pdm18 реплицировался только в респираторном тракте и не имел системного распространения по организму инфицированного человека. В гене НА нет многоосновного сайта расщепления отличительной черты высокопатогенных вирусов гриппа птиц | Taubenberger et al., 1997; Johnson and Mueller, 2002; Taubenberger, 2006; Taubenberger et al., 2007; Morens and Fauci, 2007; Neumann et al., 2009 |
| 1957-1958 H2N2 «Азиатский грипп» | Юго- Восточная Азия (Китай) | Весна (апрель 1957г.) | Глобальная пандемия (Китай, США, Европа, Япония) | Смертность – около 2 млн. человек (летальность <0,2%). Значительная циркуляция вируса началась летом в Южном полушарии, но широкое распространение зарегистрировано в Северном полушарии осенью. Менее чем за год этот субтип распространился по всему миру. Отмечалось две волны; вторая – в период с 1958 по 1959 г. охарактеризована как равнозначная или более тяжелая | Taubenberger and Morens, 2009; Klenk et al., 2011 |
| 1968 – 1970 H3N2 «Гонконгский грипп» | Китай (г.Гонконг) | Лето | Глобальная пандемия | Смертность – около 1 млн. человек (летальность <0,1%). В Европе пик произошел 1 год спустя после распространения по территории США. Наиболее восприимчивыми оказались люди моложе 20 лет | Taubenberger and Morens, 2009; Taubenberger and Morens, 2010 |
| 1977–1978 H1N1 «Российский грипп» | Китай/ Россия | Лето | Глобальная пандемия низкого класса. По другим оценкам это была крупная эпидемия | Преимущественно заболевали люди моложе 20 лет и дети. Предполагается, что вирус случайно высвободился из хранилища | Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012; Scholtissek et al., 1978; Taubenberger and Morens, 2009 |
| 2009-2010 A(H1N1)pdm09 | Мексика/ США | Зима (сер. февраля) | Глобальная пандемия | Смертность 151 700 – 575 400 смертей по всему миру. Восприимчивыми к заболеванию оказались люди молодого и среднего возраста | Neumann and Kawaoka, 2009; WHO, 2010a; Dawood et al., 2012 |

«Испанка» началась в Китае и, предполагается, с перелётными птицами была занесена на территорию США, где в одном из военных лагерей, расположенном неподалёку от города Канзас-Сити, были отмечены случаи гриппа с необычными симптомами (Barry, 2004). Но во время военных действий Первой мировой войны данные о потерях среди солдат были засекречены, поэтому первая публичная информация о тяжелой эпидемии поступила из Испании, не участвовавшей в войне, однако по территории которой проходили войска США в Европу (Taubenberger, Reid and Fanning., 2000; Taubenberger et al., 2001; WHO, 2006). Благодаря долгому периоду беспрепятственной циркуляции по планете вирус смог адаптироваться к популяции человека и приобрести смертельные свойства. Пандемия ВГ А(Н1N1)pdm1918 была самой опустошительной на Земле, вызывая у инфицированных вирусом людей массивную острую лёгочную геморрагию и отёк лёгких (Taubenberger et al., 2001). Поскольку в то время не существовало антибиотиков, то наиболее частой причиной смерти были вторичные бактериальные пневмонии.

В XX веке было две попытки реконструировать геном вируса «Испанского гриппа». Первая неудачная попытка была осуществлена в июне 1951 года группой ученых из США. Им удалось взять биопсийный материал с места массового захоронения жертв пандемии 1918 г. в районе вечной мерзлоты в г. Бревиг-Мишн (Аляска), однако последующее экспериментальное инфицирование хорьков и культуры клеток не дало положительных результатов по выявлению вируса (Crosby, 2003). В 1999 году группе учёных во главе с J.K. Taubenberger удалось реконструировать геном вируса «Испанского гриппа» благодаря новому методу - обратной генетике (Taubenberger et al., 2007). Было обнаружено, что все 8 генов ВГ А(Н1N1)pdm1918 имели большое сходство с вариантами птичьих вирусов гриппа, циркулировавших в начале XX века. Предполагается, что данный вирус проник в человеческую популяцию в период с 1915 г. по 1918 г. (Taubenberger, 2006). Другие исследователи выявили у него расширенную рецепторную специфичность и к SA α 2,3Gal, и к SA α 2,6Gal типу, что в сочетании с отсутствием антибиотиков и этиотропной терапии гриппа в те

годы стало причиной беспрецедентной смертности на планете (Glaser et al., 2005; Stevens et al., 2006). Также определено, что гены ВГ А(Н1N1)pdm1918 являются предшественниками всех последующих пандемических вариантов ВГ в XX и XXI веках: Н2N2 в 1957 году, Н3N2 в 1968 году и Н1N1 в 2009 году (Рисунок 2) (Taubenberger and Kash, 2010).

Началом первой пандемии XXI века официально считается 11 июня 2009 года, когда ВОЗ объявила 6-ю крайнюю фазу развития пандемии, вызванной вирусом А/California/07/09, или А(Н1N1)pdm09 (ВОЗ, 2009а). Новый антигенный вариант вируса гриппа начал циркулировать в середине февраля 2009 года в Мексике, в апреле перекинулся на США и Канаду, благодаря сильному миграционному потоку существующему между этими странами, а затем с потоком туристов вирус охватил и другие страны (ВОЗ, 2009а; Neumann, et al., 2009, Perez-Padilla et al, 2009; CDC, 2009). В России первый лабораторно подтвержденный случай инфицирования новым ВГ А(Н1N1)pdm09 был зарегистрирован у мужчины, вернувшегося в Москву из Нью-Йорка (США) 21 мая 2009 года (Львов и др., 2009). По данным лабораторного мониторинга начало эпидемического подъёма гриппа в РФ зарегистрировано в октябре того же года. Пик заболеваемости отмечен на 47-49-й неделе 2009 г. (вторая и третья декады ноября) (Колобухина и др., 2011). Первый случай смерти от лабораторно подтверждённого гриппа А(Н1N1)pdm09 зарегистрирован в Чите на 48-й неделе 2009 г. Большинство летальных случаев отмечено на пике заболеваемости или на 49-50-й неделе (Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012).

Пандемический вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 был описан как четверной реассортант, содержащий гены от «классического» вируса гриппа свиней Н1N1 субтипа - NA, NS и NP, от североамериканской линии вируса гриппа птиц - PB2, PA, от сезонного вируса гриппа человека Н3N2 субтипа - PB1 и от вируса гриппа свиней птицеподобной евразийской линии Н1N1 субтипа – NA и M (Рисунок 2) (Neumann and Kawaoka, 2009). Данный вирус обладал высокой контагиозностью, смог преодолеть межвидовой барьер, перейдя из популяции свиней к людям.

ВГ А(Н1N1)pdm09 был зарегистрирован более чем в 214 странах и стал причиной 151 700 – 575 400 смертей по всему миру, из которых 201 200 (диапазон 105 700 - 395 600) летальных случаев из-за поражения органов дыхания, 83 300 (диапазон 46 000 - 179 900) смертей связаны с осложнениями сердечно-сосудистой системы. Отмечено, что 80% погибших людей были моложе 65 лет, при этом 51% всех летальных случаев зарегистрирован в Юго-Восточной Азии и Африке (WHO, 2010a; WHO, 2010b; Dawood et al., 2012).

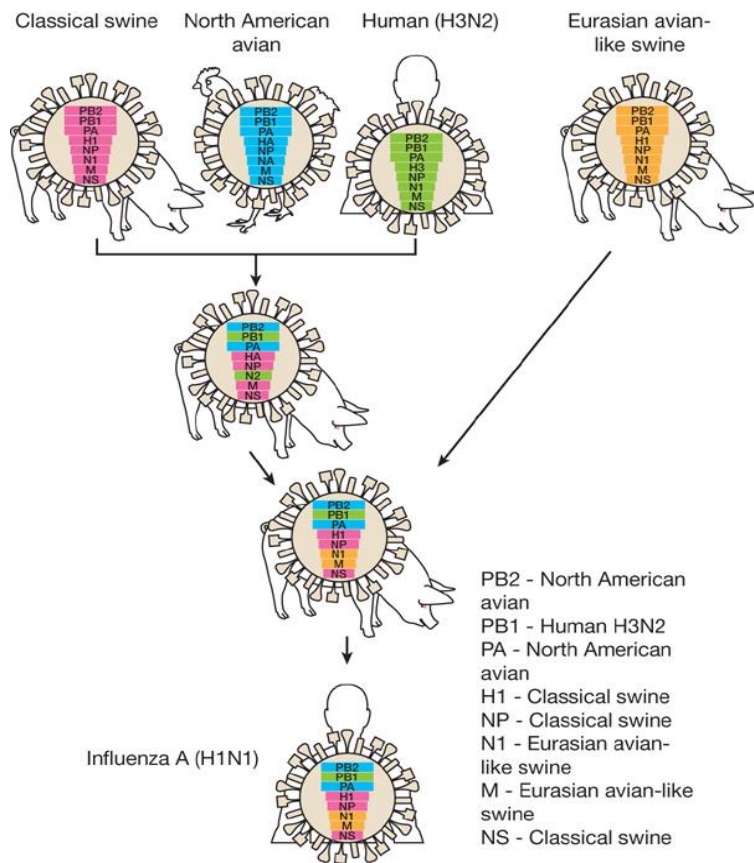


Рисунок 2. Генезис вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 (Neumann and Kawaoka, 2009).

Как уже было отмечено причиной возникновения пандемий служит появление патогенного вируса гриппа типа А с повышенной способностью быстрого его распространения среди людей воздушно-капельным путем на фоне отсутствия популяционного иммунитета к инфекционному агенту (Кузнецов, 2007). Для возможного превращения возбудителя гриппа птиц и млекопитающих в пандемический вирус должны произойти значительные изменения его свойств, а также пройти определённые этапы и механизмы их осуществления. Знание таких изменений важно в будущем для готовности человеческой популяции быть в состоянии полной медицинской готовности немедленно отреагировать в случае угрозы и развития пандемии гриппа, а также создать превентивные меры, направленные против её распространения. В соответствии с первым законом Л.В.Громашевского в эпидемическом процессе выделяют три звена инфицирования - «источник возбудителя инфекции – механизм её передачи – восприимчивое население» (Громашевский, 1962). По мнению ряда авторов, к главным условиям возникновения пандемии можно отнести следующее:

1. Ранее считалось, что единственным источником инфекции при эпидемиях и пандемиях, даже при зоонозном происхождении возбудителя, является заражённый вирусом организм человека (Смординцев, 1975). Однако события связанные с возникновением HPAIV H5N1 показали, что вирус гриппа, даже не обладая способностью передаваться от человека к человеку, а только от птицы к человеку может быть высоко смертельным для людей (Korteweg and Gu, 2010).
2. Эффективный механизм передачи и инфицирования вирусом гриппа с последующим продуктивным воспалением зависит от:
 - приобретения вирусом гриппа свойств к эффективной адсорбции и проникновению в клетки эпителия слизистой оболочки верхних дыхательных путей человека (носоглотки, трахеи, бронхов), которые, в свою очередь, являются результатом молекулярно-генетических изменений, таких как полная смена HA или NA по отношению к

существующему иммунитету против гриппа у населения или возникших мутаций в структуре HA, в результате которых молекула приобретает способность эффективно расщепляться *трипсиноподобными* протеазами клеток эпителия верхнего отдела респираторного тракта человека на две субъединицы (HA1, HA2) (Кузнецов, 2007);

- мутации в структуре рецептор-связывающего сайта (PСС; *RBD*, *Receptor-Binding Domain*) HA увеличивают афинность к рецепторам человеческого типа (SA α 2,6Gal), что позволяет вирусу преодолевать межвидовой барьер (Рисунок 3) (Киселёв и Львов, 2012; Ito et al., 1998);
 - мутационных изменений транскриптазного комплекса (PB1, PB1-F2, PB2, PA), способствующих интенсивной транскрипции вирусного генома и повышенному накоплению структурных компонентов вируса в клетках слизистой оболочки верхних дыхательных путей человека, в том числе при пониженной температуре (Кузнецов, 2007);
3. Созревшие полноценные вирионы должны обладать высокоинфекционными свойствами и способностью воспроизводиться в зараженных клетках в большом количестве (Кузнецов, 2007).
 4. Для возникшего реассортантного или адаптированного вируса в ходе последовательных непрерывных пассажей в человеческой популяции обязательно должна пройти *селекция*, направленная на усиление и закрепление способности нового патогенного вируса к высокой репродукции в клетках верхних дыхательных путей человека, сопровождающейся возрастанием контагиозности острого заболевания (Кузнецов и Степанова, 2006; Кузнецов, 2007).

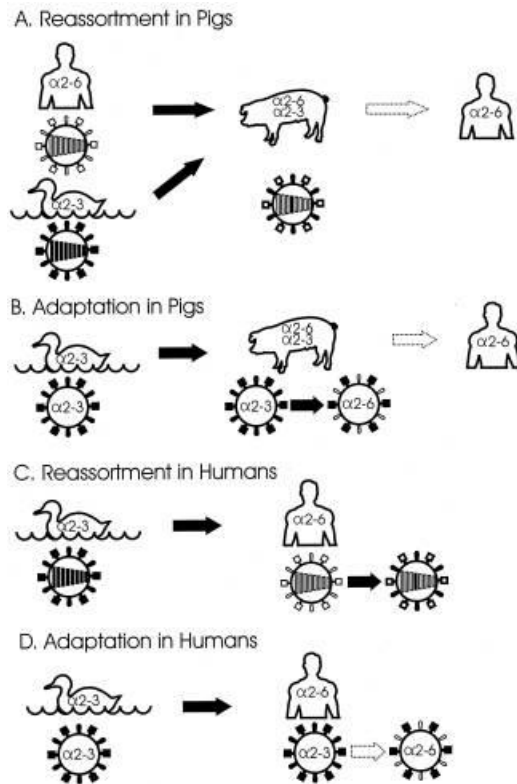


Рисунок 3. Схема возникновения пандемических штаммов, способных распознавать «человеческий» тип рецепторов (Ito et al., 1998).

(А) Классическая генетическая рекомбинация птичьего и человеческого вирусов гриппа, связывающихся, соответственно, с SAα2,3Gal и SAα2,6Gal типами рецепторов на эпителиальных клетках трахеи свиньи. В результате возникает реассортант, способный заразить значительную часть человеческой популяции. Сегменты в центре каждой частицы представляют собой вирусный геном. Реассортантный ген HA (черный цвет) происходит от птичьего вируса. (В) Адаптация птичьего вируса гриппа к связыванию с SAα2,6Gal типами рецепторов в организме свиньи, благодаря чему вновь образованный патоген приобретает способность эффективно инфицировать человека. (С) Непосредственное инфицирование человека двумя вирусами гриппа: птичьим и человеческим. (D) Адаптация птичьего вируса к организму человека при инфицировании в результате прямого контакта, что приводит к распознаванию вирусом SAα2,6Gal типа рецепторов и эффективной репликации в лёгких (Ito et al., 1998).

В результате выше перечисленных изменений возникает вирулентный высококонтагиозный пандемический ВГА, активно передающийся среди людей воздушно-капельным путём.

Одними из важных и неразгаданных вопросов современной вирусологии остаются определение периодичности возникновения пандемий и выявление конкретного патогенного субтипа вируса гриппа, родоначальника пандемии. В последние годы, особенно в период 2003 – 2006-е гг., преобладала точка зрения,

что возбудителем ближайшей пандемии будет модифицированный в естественных условиях патогенный для человека ВГ птиц нового серотипа, относящийся к Н5, Н7 или Н9 (Рисунок 4) (Львов и др., 2005; Norimoto and Kawaoka, 2001; ВОЗ, 2005; Fauci, 2006). Это предположение было основано на генетических доказательствах «птичьего» происхождения известных пандемических вирусов, на распространении панзоотии гриппа среди диких и домашних птиц в начале XXI века, а также на фактах регистрации спорадических случаев тяжелейших форм зоонозного гриппа с высокой летальностью у людей (ВОЗ, 2005; Taubenberger, 2006). Однако ни один из предполагаемых субтипов ВГА не стал причиной пандемии 2009 года.

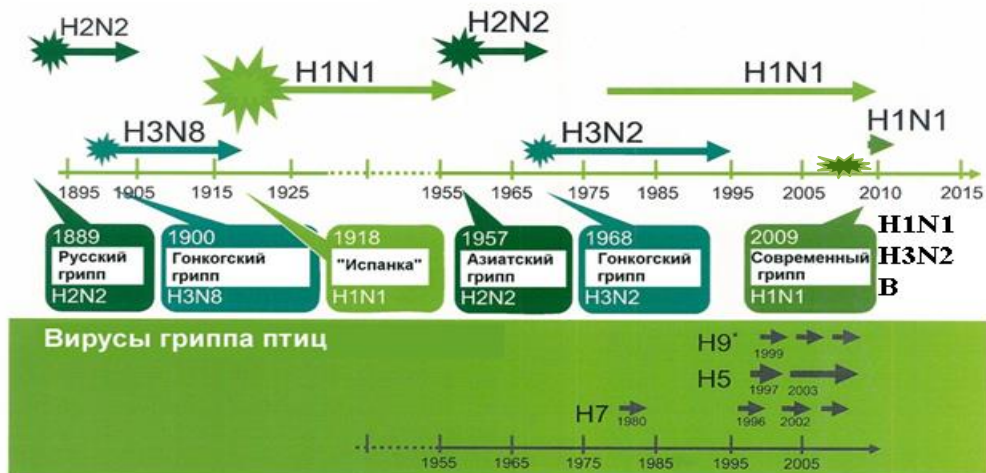


Рисунок 4 - Пандемии, вызванные различными субтипами вируса гриппа А (Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1-2009, 2011).

Особенности течения гриппозной инфекции у человека при инфицировании субтипом Н5N1 и субтипом Н1N1. Высокопатогенный вирус гриппа А/Н5N1 и пандемический А(Н1N1)pdm09 являются вновь возникшими вирусами гриппа типа А, которые недавно продемонстрировали страшную угрозу здоровью населения во многих уголках мира. Благодаря вспышке гриппа А(Н1N1)pdm09 в 2009 году мир стал свидетелем пандемической инфекции XXI века, которая быстро распространилась по всему земному шару и стала

результатом сотен тысяч подтвержденных случаев заражения (WHO, 2010a; Dawood et al., 2012). Хотя вирус 2009 года (H1N1) охарактеризован высокой степенью трансмиссии, однако до сих пор остаются сравнительно низкими его вирулентные и летальные свойства, по сравнению с HPAIV A/H5N1, для которого справедливо обратное: при уровне смертности превышающей 60% он способен вызывать тяжёлые повреждения респираторной системы человека, однако, не способен эффективно передаваться от человека к человеку (Korteweg and Gu, 2010). В отличие от чётких различий между двумя субтипами вирусов гриппа А есть некоторые существенные сходства, требующие особого внимания. В частности, более тяжёлые и смертельные заражения вирусом 2009 года A(H1N1)pdm09 показали похожие симптомы заболевания, как при инфицировании HPAIV H5N1 (Сулима, Карев и Жданов, 2010; Korteweg and Gu, 2010).

При гриппе, вызванном высокопатогенным вирусом A/H5N1, длительность инкубационного периода может быть увеличена до 8 дней. Взрослые пациенты могут быть заразны для окружающих за 1 день до появления клинических симптомов и до пяти дней после их исчезновения, а дети могут быть заразны более длительный период. Заболевание начинается остро с озноба и высокой температуры $>38^{\circ}\text{C}$, с выраженными симптомами интоксикации, возможны боли в мышцах, костях и суставах. Вирусу гриппа A/H5N1 более характерны диарея, рвота, абдоминальная и плевральная боли, носовое и десневое кровотечения, иногда даже в отсутствие респираторных проявлений (Синопальников и Белоцерковская, 2006). Отмечается поражение нижнего отдела дыхательных путей с возможным развитием первичной вирусной пневмонии. Прогрессирование заболевания сопровождается развитием дыхательной недостаточности, ОРДС и пантропизмом. Более чем у 30% инфицированных птичьим вирусом гриппа развивается острая почечная недостаточность, кроме того, отмечаются поражения головного мозга, печени, изменения лейкоцитарного состава (панцитопения: лимфопения, тромбоцитопения, лейкопения). Прогноз заболевания, вызванного вирусом гриппа A/H5N1, как правило, неблагоприятный

и характеризуется высокой смертностью - выше 60% (Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012; WHO, 2008).

При инфицировании пандемическим вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 в период 2009-2010 гг. восприимчивыми к заболеванию оказались люди молодого и среднего возраста (WHO, 2010a). В группу риска также вошли беременные женщины, дети в возрасте до 2-х лет и люди с хроническими соматическими заболеваниями (Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика, 2012). Инкубационный период при пандемическом гриппе A(H1N1)pdm09 варьирует от 1 до 7 дней, чаще 1-4 дня. Основные симптомы: лихорадка, кашель, боли в горле, насморк, ломота в суставах, головная боль, слабость, озноб. Характерной особенностью вируса гриппа A(H1N1)pdm09 является высокая контагиозность, а также повышенная частота и раннее развитие первичной вирусной пневмонии. Именно развитие данной патологии обуславливало госпитализацию пациентов, тяжесть их состояния и летальный исход (Ware and Matthay, 2000; Gerardo and Bertozzi, 2009). В 30% случаев летальных исходов отмечалось присоединение вторичной бактериальной инфекции, обычно вызываемой *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* или *Streptococcus pneumoniae* (McCullers, 2006). Наиболее частой причиной смерти являлось развитие дыхательной недостаточности и инфекционно-токсического шока. По данным патологоанатомических исследований, непосредственной причиной смерти больных с ВП являлось развитие ОРДС, морфологически представленного интерстициально-альвеолярным отёком лёгких. Клинически ОРДС проявлялся резистентной одышкой к проводимой терапии, физикальной картиной некардиогенного отёка лёгких, прогрессирующим снижением сатурации, т.е. уровня насыщения кислородом гемоглобина, и обширным затемнением лёгочных полей по данным рентгенографии (Лукьянов и др., 2010).

За последние годы субтипы ВГ A/H5N1 и A(H1N1)pdm09 в результате мутаций постепенно изменили свои биологические свойства и приобрели способность не только преодолевать видовой барьер с непосредственным

инфицированием человека, но и вызывать чрезвычайно тяжёлые клинические формы заболеваний, часть которых заканчивается летально. В связи с вызывающим опасения пандемическим потенциалом обоих субтипов ВГА А/Н5N1 и А(Н1N1)pdm09 проводятся исследования по изучению роли отдельных генов, ограничивающих хозяйскую специфичность и влияющих на механизм преодоления видового барьера, и картирование детерминант патогенности, которые расширяют спектр генов и соответствующих белков, вносящих вклад в вирулентность (Таблица 3).

Таблица 3. База данных об известных молекулярных маркерах патогенности вируса гриппа А на примере субтипа H1N1 и субтипа H5N1.

| Принятый номер сегмента ⁶ | Кодируемые белковые продукты | Маркёры патогенности | Функции | Литература |
|--------------------------------------|------------------------------|----------------------|---|---|
| 1 | PB2 | E158G/A | Данная мутация значительно увеличивает транскрипционную и репликативную активность у адаптированного варианта вируса гриппа А(H1N1)pdm09 к мышам | Pyushina et al., 2010 |
| | | E627K | Данная мутация играет ключевую роль для адаптации репликации при пониженной температуре. Так вместо привычного для вируса гриппа 41°C у субтипов H5N1 и H1N1 возникает способность реплицироваться при 33°C в организме человека; увеличивается трансмиссивная способность передачи птичьих вирусов; возрастает вирулентность на мышах. У А(H1N1)pdm1918 была обнаружена а.к. замена K627. Статистические данные про А(H1N1)pdm09: 627E 99,6% 627K 0,4% | Kawaoka and Webster, 1988; Subbarao, Kawaoka and Murphy, 1993; Massin, van der Werf and Naffakh, 2001; Hatta et al., 2007; Steel et al., 2009; Van Hoeven et al., 2009; Carlos et al., 2009 |
| | | R54K | Обнаружена у беременных заболевших ВГА(H1N1)pdm09 | Giria et al., 2012 |
| | | T271A+590S/591R | T271A увеличивает полимеразную активность у ВГА H5N1 в клетках животных. Сочетание а.к. замен отвечает за эффективную репликацию и адаптацию ВГ А(H1N1)pdm09 у млекопитающих | Fukuyama and Kawaoka, 2011; Liu et al., 2012 |
| | | D701N | У ВГА H5N1 увеличена репликативная активность в клетках мышей. У ВГА А(H1N1)pdm09 данной а.к. замены не обнаружено | Fukuyama and Kawaoka, 2011 |
| 2 | PB1 | S384L | Обнаружена у беременных заболевших ВГА(H1N1)pdm09 | Giria et al., 2012 |
| | PB1-F2 | N66S | Данная а.к. замена индуцирует апоптоз клеток хозина. У ВГА субтипа А(H1N1)pdm1918 отмечена высокая патогенность, повышенная вирусная репликация; у инфицированных регистрируется резкое снижение веса и низкая выживаемость. У ВГА субтипа H5N1 отмечены аналогичные симптомы | Conenelo et al., 2007; Giria et al., 2012 |

⁶Согласно последней номенклатуре сегментов генома ВГА (М.Ю. Щелканов и др., 2011)

продолжение таблицы 3. База данных об известных молекулярных маркерах патогенности вируса гриппа А на примере субтипа H1N1 и субтипа H5N1.

| | | | | |
|---|---------|---------------------------------------|--|---|
| | | | как и у субтипа A(H1N1)pdm1918. У ВГА A(H1N1)pdm09 данной а.к. замены не обнаружено, но зарегистрирован усеченный белок, состоящий из 11 а.к. Возможно, по этой причине он был не функциональным и не обладал высокой патогенностью | |
| | PВ1 N40 | н/о ⁷ | н/о | |
| 3 | РА | T97I | У ВГА H5N1 является адаптивной мутацией к мышинной модели | Fukuyama and Kawaoka, 2011 |
| | | I127V | У ВГА H5N1 отмечается повышение вирулентности. Статистические данные про A(H1N1)pdm09: 127V 99,7% 127I 0,3% | Subbarao and Shaw, 2000; Lycett et al., 2009; Carlos et al., 2009 |
| | | P224S D347N | Обнаружены у беременных инфицированных ВГА(H1N1)pdm09 | Giria et al., 2012 |
| | | L295P | При изучении адаптации пандемического вируса A(H1N1)pdm09 на хорьковой модели данная ам.замена в сочетании с HA (K154Q) были результатом селекции вируса с улучшенной репликацией и вирулентностью | Pyushina et al., 2010 |
| | | E298K | Данная а.к. замена в комплексе с NP (D101G) и HA(D131E, S186P, A198E) вызывают летальный исход при инфицировании адаптированным к организму мышей ВГ A(H1N1)pdm09 | Ye et al., 2010 |
| | РА-X | н/о | н/о | |
| 4 | НА | V100I | Увеличивает вирусную трансмиссию/эффективность | Giria et al., 2012 Ye et al., 2010 |
| | | D131E+S186P | Мутации возникшие в HA1 в результате адаптации к организму мышей ВГ A(H1N1)pdm09 | Kao et al., 2012 |
| | | K119N+G155E+ S183P+R221K+ D222G | | Pyushina et al., 2010 |

⁷ н/о – не определено

продолжение таблицы 3. База данных об известных молекулярных маркерах патогенности вируса гриппа А на примере субтипа Н1N1 и субтипа Н5N1.

| | | | | |
|--------------------|---------------------|---|--|---|
| 4 (продолжение) | НА (продолжение) | T134A | Увеличивается рецептор-связывающая активность у ВГА Н5N1 с усилением вирулентности | Imai et al., 2010 |
| | | S145F (нумерация по H3) | Отвечает за устойчивость ВГА Н5N1 к действию моноклонального антитела и снижает вирулентность, однако она может быть восстановлена при возникновении доп. а.к. замены N186I в НА | Крылов и др., 2009 |
| | | (RBD) N158D | На примере ВГА А/СССР/90/77 (H1N1) показано увеличение сродства вируса с рецепторами SA α 2,6Gal | Маринина и др., 2003 |
| | | Сочетание двух а.к. замен D190E и D225G | Отвечает за смену рецептор-связывающего предпочтения с SA α 2,6Gal на SA α 2,3Gal | Glaser et al., 2005 |
| | | Сочетание двух а.к. замен 190D и 225D | Отвечают за связывание с рецепторами SA α 2,6Gal (возможно, наличие аспаргиновой кислоты (D) в обоих остатках аминокислот у вируса А(H1N1)pdm18 объясняет эффективную способность инфицировать человека) Статистические данные про А(H1N1)pdm09: 190D 90,7% 190N 7,4% 190V 1,8% | Stevens et al., 2006; Carlos et al., 2009 |
| | | Сочетание двух а.к. замен 190D и 222D (в системе H3 - 225) | У ВГА А(H1N1)pdm1918 отмечено увеличение связывания с рецептором SA α 2,6Gal типа | Stevens et al., 2006 |
| | | Сочетание двух а.к. замен 190D и 220G (в системе H3 - 225) | У ВГА А(H1N1)pdm1918 отмечено связывание с двумя типами рецепторов SA α 2,6Gal и SA α 2,3Gal | |
| | | Сочетание двух а.к. замен 190E и 220G (в системе H3 - 225) | У ВГА А(H1N1)pdm1918 отмечено увеличение связывания с рецептором SA α 2,3Gal типа | |

продолжение таблицы 3. База данных об известных молекулярных маркерах патогенности вируса гриппа А на примере субтипа H1N1 и субтипа H5N1.

| | | | | |
|--------------------|---------------------|---|--|--|
| 4 (продолжение) | НА (продолжение) | Сочетание двух а.к. замен Q192R и N182K | Данные две а.к. замены у ВГ А/Н5N1 приводят к смене рецептор-связывающего предпочтения с SA α 2,3Gal на SA α 2,6Gal. Статистические данные про А(Н1N1)рdm09: 192Q 70% 192K 30% 182I 70% 182V 30% | Yamada et al., 2006; Carlos et al., 2009 |
| | | A200T | Лекарственная устойчивость к занамивиру. Статистические данные про А(Н1N1)рdm09: 200A 98,6% 200T 1,4% | Tumpey et al., 2007; Baz, Abed and Boivin, 2007; Carlos et al., 2009 |
| | | (RBD) D222G | Впервые одиночная мутация в рецептор-связывающем сайте вируса гриппа А(Н1N1)рdm09 была выделена на территории РФ и Норвегии. Затем появились и другие сообщения о выделении мутантных вирусов от больных с тяжёлыми формами гриппозной инфекции, а также летальных случаях. Кроме того, данная а.к. замена была обнаружена и в геноме вируса А(Н1N1)рdm1918. Было определено: данная мутация усиливает патогенность, но не оказывает влияния на трансмиссивность. Модифицированный вирус обладает повышенным сродством к альвеолярным макрофагам и пневмоцитам II-го типа, а также к клеткам трахеи, реснитчатым клеткам бронхов и к бронхиолярному подслизистому эпителию | Львов и др., 2010; Цинзерлинг и др., 2011; Киселёв и Львов, 2012; Liu et al., 2010; Kilander et al., 2010; Chan et al., 2011 |
| | | (RBD) D222N/G | Зарегистрирована среднетяжелая степень (1/8) и летальная форма заболевания (17/18) | Львов и др., 2010 |
| | | (RBD) D222E/G | Не обнаружено связи между заменой а.к. и тяжестью заболевания. | Агафонов и др., 2011 |
| | | (RBD) D222G/N/E 15%/15%/2% | Двойная рецепторная специфичность к SA α 2,3Gal и SA α 2,6Gal рецепторам, но с преобладанием к SA α 2,3Gal типу рецепторов. | Львов и др., 2009 |
| | | (RBD) сочетанная мутация D222G и H275Y | Данная сочетанная мутация в HA1, вероятно, спровоцировала смертельное заболевание у человека (известен только 1 случай). | de Vries et al., 2012 |

продолжение таблицы 3. База данных об известных молекулярных маркерах патогенности вируса гриппа А на примере субтипа H1N1 и субтипа H5N1.

| | | | | |
|--------------------|---------------------|---|--|---|
| 4 (продолжение) | НА (продолжение) | (RBD) D222G | Отвечает за эффективное связывание с рецепторами SA α 2,3Gal типа преимущественно в нижней части респираторного тракта. | Lin et al., 2009; Baldanti et al., 2011 |
| | | Сочетание двух а.к. замен D222G и G155E | Увеличение репликация вируса в ПКЭ. | Shikov et al., 2011 |
| | | N224K+Q224L+N158D+T318I | Данные мутации получены в эксперименте по адаптации ВППП H5N1 на хорьковой модели. Получен высококонтагиозный штамм. Данные замены положительно влияют на контактный путь передачи ВГА. Мутации N224K и Q224L имеют ключевое значение при распознавании рецепторов SA α 2,3Gal типа. | Imai et al., 2012 |
| | | Q222L и G228S T156A и N158D | Играют ключевую роль при трансмиссивности у хорьков. Данные мутации сопровождаются утратой сайта гликозилирования, что делает вирусы опасными для человека и животных | Herfst et al., 2012 |
| | | Q226L и G228S | У ВГА субтипов H3 и H2 аминокислоты в положении 226Q и 228G отвечают за связывание с рецепторами SA α 2,3Gal, а в положении 226L и 228S - за связывание с рецепторами SA α 2,6Gal типа. Статистические данные про A(H1N1)pdm09: 226Q 95% 226R 5% 228G 100% | Connor et al., 1994; Burnett et al., 1999; Reid and Tautenberger, 2003; Carlos et al., 2009 |
| | | (RBD) S227I | У ВГ A/H5N1 она снижает способность поддерживать вирулентность у мышей, но не у инфицированных цыплят. Статистические данные про A(H1N1)pdm09: 227E 99,6% 227K 0.04% | Hatta et al., 2001; Carlos et al., 2009 |
| | | Сайт расщепления НА | Имеет только один аргининовый остаток (R), как и у LPAI, который разрезается только тканеспецифичной протеазой (например, триптазой Клара), в отличие от HPAI ВГА субтипов – H5 и H7 – находятся множество а.к. остатков, которые распознаются убиквитиновыми протеазами, что, в свою очередь, приводит к системному распространению вирусов в инфицированном организме. | Horimoto et al., 1994 |

продолжение таблицы 3. База данных об известных молекулярных маркерах патогенности вируса гриппа А на примере субтипа Н1N1 и субтипа Н5N1.

| | | | | |
|---|----|--|--|---|
| | | K154Q | При изучении адаптации пандемического вируса А(Н1N1)pdm09 на хорьковой модели данная ам.замена в сочетании с РА (L295P) были результатом селекции вируса с улучшенной репликацией и вирулентностью | Pyushina et al., 2010 |
| | | G225D | У ВГА отмечено изменение вирусной специфичности во время адаптации птичьих вирусов гриппа к новому хозяину: к человеку или к свинье. | Lin et al., 2009 |
| | | K226Q | Замена обнаружена при культивировании в РКЭ адаптированного сезонного вируса гриппа Н1N1 | Lin et al., 2009; Kao et al., 2012 |
| | | (Ca)S220T (Ca)A156T (Ca)D185N (H1)D239G/H | Одна из главных несинонимичных замен, характерных для А(Н1N1)pdm09. Такая же замена была у вируса А(Н1N1)pdm1918. Клинически тяжелый случай, эта же замена была у вируса А(Н1N1)pdm1918. Смертельный случай | Morlighem et al., 2011 |
| | | (HA2) E374K | Данная адаптивная мутация вызвала пик заболеваемости вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 в 2009-2010 гг. | Lin et al., 2009; Ye et al., 2010; Kao et al., 2012 |
| | | D131E S186P A198E | Данные три а.к. замены + РА (E298K) + NP (D101G) вызывают летальный исход при инфицировании адаптированным к организму мышей ВГА А(Н1N1)pdm09. | |
| 5 | NP | L122Q | У ВГА Н5N1 увеличивает репликационную активность. | Gubareva et al., 1996; Gubareva, 2004; Carlos et al., 2009; Ye et al., 2010; Pyushina et al., 2010; Giria et al., 2012; Song et al., 2013 |
| | | D101G | Данная а.к. замена в комплексе с РА (E298K) и HA(D131E, S186P, A198E) вызывают летальный исход при инфицировании адаптированным к организму мышей ВГА А(Н1N1)pdm09. | |
| | | E119G/A/V/D R292K (N2) R292K (N1) H274Y | Лекарственная устойчивость к занамивиру у ВГА Н1N1 (1933) и Н1N9. Лекарственная устойчивость к озельтамивиру у ВГА Н1N1 (1947) и Н1N1. Лекарственная устойчивость к новым препаратам – Перамивир R292K. Статистические данные про А(Н1N1)pdm09: 119E 100% 292R 100% 274H 85% 274Y 85% | |
| | | K154Q + L295P | Сочетание мутаций отвечает за более вирулентный | |
| | | | | Pyushina et al., 2009; Ducatez et |

продолжение таблицы 3. База данных об известных молекулярных маркерах патогенности вируса гриппа А на примере субтипа H1N1 и субтипа H5N1.

| | | | | |
|---|-----|--|--|--|
| | | | фенотип у А(H1N1)pdm09 | al., 2012 |
| 6 | NA | V106I V155H I223V | Регистрируется чувствительность ВГА к озельтамивиру | Giria et al., 2012 |
| | | E119V R292K N294S | Устойчивость к озельтамивиру. Отмечено, что а.к. замена R292 отвечает за снижение трансмиссивной способности | Kiso et al., 2004 |
| | | N248D | Одна из главных несинонимичных замен, характерных для ВГ А(H1N1)pdm09. Отмечена чувствительность к озельтамивиру | Morlighem et al., 2011; Giria et al., 2012 |
| | | H275Y N295S | Устойчивость некоторых штаммов ВГА, в том числе H5N1 и А(H1N1)pdm09 к озельтамивиру | Morlighem et al., 2011; deVries et al., 2012; |
| | | D451G | Первый зарегистрированный случай инфицирования вирусом А(H1N1)pdm09 на территории РФ. Пациент выздоровел | Львов и др., 2009 |
| 7 | M1 | I123V | Регулирует клеточный апоптоз, и т.о., предполагается, играет роль в адаптации к человеку и увеличивает вирулентность | Giria et al., 2012 |
| | M2 | G14E+L55F V28L+S31N S31N | Отвечает за трансмиссию вирусов гриппа от человека к человеку. Отмечается резистентность штаммов А(H1N1)pdm09 к амантадину и ремантадину. А.к. замена S31N отвечает за устойчивость к лекарствам адамантанового ряда | Pan and Jiang, 2009; Pielak, Schnell and Chou, 2009; Garten et al., 2009; Arias et al., 2009 |
| 8 | NS1 | D92E | Было обнаружено, что данная замена повышает устойчивость к фактору некроза опухолей α и γ интерферону в эксперименте при инфицировании ВГА H5N1 свиней | Seo et al., 2002 |
| | | Делеция 1-99; 1-126 | Мутантные формы ВГА H5N1 обладают сниженной патогенностью и используются в качестве аттенуированных вирусных вакцин | Garcia-Sastre et al., 1998 |
| | | I123V | Расположен в эффекторном домене и функциональном районе, регулирующем клеточный апоптоз. Предполагается, играет роль в адаптации ВГ А(H1N1)pdm09 к человеку и усилении вирулентности | Pan et al., 2010 |

продолжение таблицы 3. База данных об известных молекулярных маркерах патогенности вируса гриппа А на примере субтипа Н1N1 и субтипа Н5N1.

| | | | | |
|--|-----------|------------------------------|--|---------------------------------------|
| | | 196K/E | А.к. замены в С-концевой области эффекторного домена определяет функциональные различия у ВГА Н5N1 | Garcia-Sastre et al., 1998 |
| | | N200S G205R | У ВГА Н5N1 обнаружено увеличение антагонистической активности к интерферону I | Imai et al., 2010 |
| | NS2 (NEP) | I31M и Y56H/L T47A и M51I | Участвует в усилении вирулентности у ВГА Н5N1 | Arias et al., 2009; Imai et al., 2010 |

1.4 Выбор и обоснование оптимальных экспериментальных моделей и условий для изучения патогенеза гриппозной инфекции и адаптации пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09

При изучении вируса гриппа и методов лечения гриппозного заболевания во всем мире широко используются различные модели экспериментальных животных, однако лучшей экспериментальной моделью для изучения вируса гриппа являются волонтеры. По официальным данным в мире существует только один центр, проводящий свои исследования в лабораторных условиях на добровольцах возраста от 18 до 45 лет, с целью изучения развития гриппозного заболевания и создания вакцин. Центр называется FluCamp (www.flucamp.com), он расположен в г. Лондоне (Великобритания). Данная модель показывает действительную картину заболевания в организме человека, однако не представляется возможным изучить тяжёлые, летальные случаи инфицирования, определить влияние гриппа на организм людей младше 18 лет, а также изучить патологии у беременных. В связи с этим, наиболее широко в вирусологических лабораториях используются экспериментальные животные, на примере которых возможно изучение НРАIV, среди которых распространёнными моделями животных являются мыши, птицы и хорьки (Bouvier and Lowen, 2010; Imai et al., 2010; Chen et al., 2010). Одной из наиболее важных характеристик при изучении биологических свойств ВГА на модельных животных является схожесть патологических процессов с человеческими среди таких показателей как клинические признаки болезни, гистологические изменения тканей внутренних органов, кинетика продукции вируса и трансмиссивность (Bouvier and Lowen, 2010). Модельных животных разделяют на восприимчивых к человеческим штаммам вируса гриппа и животных, которым требуется предварительная вирусная адаптация патогена (Tumpey et al., 2005; Itoh et al., 2009; Alberts et al., 2010).

В качестве экспериментальных животных в исследованиях широко используют мышей (*Mus musculus*). К достоинствам данной модели можно

отнести наибольшую охарактеризованность этого типа животных, низкую стоимость, небольшие размеры тела, неагрессивное поведение, а недостатком является иное расположение сиаловых рецепторов в лёгких по сравнению с человеком (Bouvier and Lowen, 2010). При изучении гриппозной инфекции используются как инбредные (BALB/c, C57Bl/6, DBA/2J, A/J), так и аутбредные (CD1, ICR) мыши (Шестопалова и др., 2011; Mori and Kimura, 2001; Bouvier and Lowen, 2010; McHugh et al., 2013). Заражение обычно проводят интраназально, применяя дозу в 5-10 МЛД₅₀, а в некоторых случаях вирусосодержащую жидкость (ВСЖ) наносят непосредственно на слизистую трахеи во время хирургической операции (Lee et al., 2013). Патогенность вирусов гриппа в мышинной модели характеризуют на основании результатов титрования вируса на мышах с привязкой к тканевой цитопатической дозе (ТЦД; *tissue culture infectious dose*, TCID₅₀), к эмбриональному инфекционному титру (эмбриональная инфекционная доза, ЭИД₅₀) или к бляшкообразующей единице (БОЕ, *plaque forming units (PFU)*) (WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, 2010). Данная модель является удобной для изучения патогенеза вируса гриппа, поскольку в организме мышей под воздействием гриппозной инфекции развивается интерстициальная пневмония аналогичная той, что развивается в лёгких человека (Sweet and Smith, 1980).

Традиционно базовой моделью гриппа являются хорьки (*Mustela Putoris*), поскольку они являются чувствительными ко многим штаммам вируса гриппа без предварительной вирусной адаптации и имеют схожее с организмом человека расположение SA α 2,3Gal и SA α 2,6Gal рецепторов в лёгких (Bouvier and Lowen, 2010). Инфицирование проводят интраназально, применяя стандартную дозу в 10⁵ или 10⁶ ЭИД₅₀ (WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, 2010). В настоящее время в двух ведущих лабораториях по гриппу в Университете Висконсин-Мэдисон (США) и в Медицинском центре Эразмуса в Роттердаме (Нидерланды) исследователи создали мутантные штаммы H5N1, передающиеся воздушно-капельным путём среди хорьков (Imai et al., 2012; Herfst

et al., 2012). Противоречивые исследования были приостановлены по причине возникновения возможных рисков для здоровья населения планеты и вероятных террористических актов в связи с тем, что вирус гриппа давно признан реальным объектом для использования его в качестве биологического оружия (Madjid et al., 2003).

Для моделирования гриппозной инфекции также используются птицы. Наиболее чувствительными к вирусу гриппа являются куры и индейки, в меньшей степени чайки, фазаны, перепелки, утки, гуси, цесарки, павлины и страусы (Вирусные болезни животных, 1998; Сайфутдинова и др., 2012; Шаршов и др., 2012; Easterday, Hinshaw and Halvorson, 1997). Инфицирование производится путём нанесения ВСЖ на слизистые оболочки носовых ходов, конъюнктивы глаз и ротовой полости в дозе 10^6 ЭИД_{50/мл}. Заболевание протекает остро. Клиническими проявлениями болезни после инфицирования патогенными для птиц штаммами вируса гриппа являются: цианотичность гребня и серёжек (у кур), повышение температуры тела, вытягивание головы вверх, кривошея, хождение по кругу, запрокидывание головы назад, последующее наступление судорог и гибель. Патогенность вирусов гриппа в данной модели характеризуют на основании результатов титрования вируса на птицах с привязкой к индексу патогенности при внутривенном введении (*intravenous pathogenicity index, IVPI*). Штаммы ВГ, относящиеся к высокопатогенным, имеют значения IVPI > 1,2 и вызывают смертность у кур > 75% (ОИЕ, 2010).

В последнее время в качестве модельные животные стали рассматривать коты. Заражение тигров в зоопарке Таиланда и котов в Германии показало, что представители семейства кошачьих являются чувствительными к гриппу птиц и погибают от схожего с человеческим заболевания. Серия исследований показала, что расположение рецепторов у кошачьих схожа с таковой у людей. В связи с тем, что коты доступны в больших количествах и существует возможность обеспечения серонегативности по отношению к вирусам гриппа А, использование

данной модели возможно (Kuiken et al., 2004; Amonsin et al., 2005; Rimmelzwaan et al., 2006).

Обезьяны (*Macaca mulatta*, *Macaca nemestrina*, *Macaca fascicularis*) редко используются для моделирования ВГА из-за своей дороговизны, сложных требований к содержанию и этических вопросов применения данной модели. Считается, что обезьяны лучше моделирует реакцию на ВГ, чем животные, рассмотренные ранее из-за генетических и физиологических сходств с человеком (Bouvier and Lowen, 2010). Однако недавно проведенные исследования выявили особенность инфицирования альвеолярных клеток у приматов – в отличие от человека НРАIV А/Н5N1 поражает альвеолоциты I типа (van Riel et al., 2007). В основном на приматах проводятся исследования по изучению НРАIV А/Н5N1 и пандемического А(Н1N1)pdm1918 (Rimmelzwaan et al., 2001; Rimmelzwaan et al., 2003; Kuiken et al., 2003; Kobasa et al., 2007).

Некоторые исследования проводятся на морских свинках (*Cavia porcellus*), на хомячках (*Mesocricetus auratus*) и хлопковых крысах (*Sigmodon hispidus*), которые также как и хорьки являются высокочувствительными к ВГ. Однако, недостатком в модели морских свинок считается отсутствие внешних признаков гриппозной болезни (Bouvier and Lowen, 2010). Кроме того, некоторые исследователи показали отсутствие у них вирусемии НРАIV А/Н5N1 (Gao et al., 2009; Kwon, Lipatov and Swayne, 2009). На хомячках и хлопковых крысах проводят исследования по изучению ВГ А и В типов (Ali et al., 1982; Ottolini et al., 2005).

Кроме того, известны исследования на миниатюрных свиньях (mini pig) (Brookes et al., 2010). На данной модели проводятся изучения субтипов Н1N1, Н7N9, рецептор-связывающих особенностей ВГ в лёгких свиней и механизмы адаптации ВГ (Xu et al., 2014).

В лабораторной диагностике с целью изучения вирусной инфекции, вопросов патогенеза и иммунитета, а также для получения диагностических и вакцинных препаратов применяют культивирование вируса *in vitro* или *ex vivo* на примере развивающихся куриных эмбрионов (ПКЭ) и культуры клеток (WHO

Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, 2010). К достоинствам модели РКЭ относятся возможность накопления вирусов в больших количествах, стерильность объекта, отсутствие скрытых вирусных инфекций, простота техники работы, к недостаткам – то, что данная модель применяется в основном для изучения птичьих вирусов (Avian Influenza Virus, 2008). На культуре клеток анализируется широкий спектр штаммов ВГА с оценкой цитопатического эффекта (ЦПЭ; или *цитопатическое действие*, ЦПД) – это видимые под микроскопом дистрофические изменения клеток культуры вплоть до их гибели под разрушительным воздействием ВГ (Руководство по ветеринарной вирусологии, 1966; Репродукция и выращивание вирусов животных, 1976).

1.5 Изучение адаптации вируса гриппа А(Н1N1)pdm09

Адаптация вируса – это процесс, направленный на селекцию патогена с мутантным набором генов, который увеличивает приспособительные и вирулентные свойства вируса по отношению к восприимчивому хозяину. В природе адаптация вирусов происходит спонтанно и непредсказуемо, что затрудняет прогнозирование эпизоотий и пандемий и, соответственно, готовность к вновь возникающим высокопатогенным агентам. В лабораторных условиях можно направленно и контролируемо провести адаптацию ВГА и получить адаптированный вариант со 100% летальностью для экспериментальной группы, что поможет выявить специфические изменения, которые происходят в геноме вируса при взаимодействии с клеткой-мишенью. Помимо этого, в современной вирусологии используются методы генной инженерии, а именно, с помощью метода обратной генетики можно сконструировать патогенные варианты с определенным набором аминокислотных замен относительно непандемичных вариантов и с точностью установить маркёры патогенности. Одной из актуальнейших проблем современной вирусологии является изучение адаптации вируса гриппа как опаснейшего инфекционного заболевания к новым хозяевам, в том числе, к человеку.

Вспышка ВГ А(H1N1)pdm09 в 2009 году вызвала первую пандемию в XXI веке и в связи с высокой степенью трансмиссивности (способность эффективно передаваться от человека к человеку) данного вируса появилось опасение, что в случае усиления вирулентных свойств патогена путём адаптации к организму человека, вероятно, возникнет новый адаптированный вариант, обладающий значительным эффектом на здоровье населения планеты (Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1-2009, 2011). Понимание механизмов адаптации и эволюции ВГ к новым хозяевам позволит изучить процесс преодоления вирусом межвидового барьера и превращения в пандемический штамм. Изучение течения заболевания в лёгких экспериментальных животных позволяет лучше понять патогенез вирусной инфекции и механизм адаптации ВГ. Мышиная модель является наиболее распространённой для изучения механизмов вирусной адаптации и изменений вирулентности ранее непатогенных штаммов ВГ (Киселев и Львов 2012; Rolling et al., 2009; Iyushina et al., 2010; Xu et al., 2011; Sakabe et al., 2011; Garigliany et al., 2010; McHugh et al., 2013). Целесообразность изучения патологических процессов в лёгких, происходящих при адаптации ВГ к мышам, является адекватным методическим подходом, поскольку патологические изменения, возникающие в лёгких мышей, сходны с изменениями при вирусных пневмониях у человека (Sweet and Smith, 1980). Кроме того, изучение молекулярно-генетических закономерностей адаптации ВГ к мышам позволяет подойти к решению актуальных фундаментальных проблем: определению генетических маркёров патогенности и механизмов их возникновения, изучению роли отдельных генов вируса в патогенезе инфекции, а также выявлению молекулярных основ преодоления межвидового барьера.

Предыдущие исследования показали, что вирусные белки PB1, PB2, NA, NP, NA, M1 и NS1 часто подвергаются мутациям (Таблица 3) (Киселев и Львов 2012; Iyushina et al., 2010; Ye et al., 2010; Fukuyama and Kawaoka, 2011; Morlighem et al., 2011; Giria et al., 2012; Liu et al., 2012; Song et al., 2013). Считается, что сочетанные мутации в вирусных белках PB1, PB2, NA и NS1 являются основными факторами, ограничивающими круг хозяев (Rogers et

al., 1983; Seo et al., 2002; Shinya et al., 2004; Shinya et al., 2006; Naffakh et al., 2008). Некоторые исследователи предполагают, что вероятный сценарий адаптации пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 скорее будет развиваться по пути антигенного дрейфа, а не антигенного шифта (Ilyushina et al., 2010). Предполагается, что адаптированные варианты ВГ A(H1N1)pdm09 к организму экспериментальных мышей обладают свойством вирусемии аналогично HPAIV A/H5N1, инфицируя внутренние органы нереспираторной системы, поскольку при адаптации у вируса гриппа увеличивается способность связываться с SA α 2,3Gal рецепторами и при этом снижается связывающая способность к SA α 2,6Gal рецепторам (Ilyushina et al., 2010).

Процесс адаптации ВГ к новому хозяину включает в себя мутации в различных генах и, как следствие, изменение биологических и антигенных свойств вируса. Сочетание новых свойств вируса и факторов, обусловленных клетками хозяина, в результате приводят к появлению высокой вирулентности вируса гриппа. Соотношение этих факторов до сих пор остается не ясным и, вероятно, зависит от штаммовых и видовых различий. Получение и осмысление новых экспериментальных данных даст более чёткое представление о процессах преодоления вирусом межвидового барьера, о молекулярных основах патогенности и механизмах возникновения ВГА с пандемическим потенциалом.

1.6 Заключение по обзору литературы

Грипп является значительной угрозой для глобального общественного здравоохранения, поскольку остается до настоящего времени неуправляемой вирусной инфекцией, наносящей существенный ущерб здоровью населения и экономике стран во всем мире. Непрерывная циркуляция, постоянная мутация вируса гриппа и его высокая контагиозность приводит к появлению новых подтипов вируса, против которых нет иммунитета как у животных, так и у людей.

Важным направлением в изучении вирусов гриппа с пандемичным потенциалом является идентификация принципиально новых детерминант патогенности, которые позволяют вирусам преодолевать межвидовой барьер и

адаптироваться к популяции человека с последующим распространением по всей планете высококонтагиозного и смертельного заболевания. В настоящее время существует множество исследовательских работ посвященных детерминантам патогенности, однако, до сих пор не достигнута полная ясность в данном вопросе. Вирусы гриппа вызывают ежегодные эпидемии и случайные пандемии, которые унесли миллионы людских жизней. Возникновение новых штаммов будет по-прежнему создавать проблемы для общественного здравоохранения и научных кругов.

В настоящее время существует опасение, что если вирус гриппа A(H1N1)pdm09 сохранит способность эффективно передаваться от человека к человеку и при этом усилит свои вирулентные свойства, благодаря адаптации к организму человека, то новый адаптированный вариант, возможно, будет обладать весьма значительным влиянием на здоровье населения планеты, что увеличит число смертельных исходов.

В связи с этим целью данной работы - оценка фено- и генотипа пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 при его адаптации к мышам.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведение работ с клиническими образцами одобрено решением этического комитета IRB 00001360 при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 2 от 20.05.2008 г.) и решением комитета по биомедицинской этике при ФГБУ "НЦКЭМ" СО РАМН (решение №25 от 19.11.2012 г.) (приложение № 1). Все работы с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, а также в соответствии с протоколом исследования, утверждённым биоэтическим комитетом "Вектор".

Вирусы. Штамм *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)* (*Tomsk/2010*) (KP307943-KP307950) вируса гриппа А изначально был выделен из носоглоточного смыва человека в январе 2010 г. (2-й пассаж на культуре клеток MDCK (Madin-Darby canine kidney) с титром вируса $5,625 \pm 0,6 \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$). Исход заболевания благополучный. Выделенный штамм был адаптирован к экспериментальным мышам инбредной линии BALB/c и линии C57BL/6z, а также к аутбредным мышам CD1. Полученные три варианта пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 депонированы в GenBank под названиями *A/Tomsk/273-MA1/2010(H1N1pdm09)* (MA-BALB/c) (KM277585-KM277592), *A/Tomsk/273-MA2/2010(H1N1pdm09)* (MA-C57BL/6z) (KM277593-KM277600) и *A/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09)* (MA-CD1) (KM277601-KM277608), соответственно. Дикий штамм *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)* и три адаптированных его варианта депонированы в Музей вирусов гриппа и ОРЗ

ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ (г. Санкт-Петербург) под номерами 5409, 5410, 5411 и 5412, соответственно.

Штамм *A/Novosibirsk/13/2009(H1N1)pdm09 (N13-2009)* (GU211227.1, GU211229.1, GU211231.1, GU211233.1, GU211228.1, GU211230.1, GU211234.1) (2-й пассаж на культуре клеток MDCK с титром вируса $6.30 \pm 0.24 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$) выделенный в сентябре 2009 года от 28-летней женщины вернувшейся из-за границы. Исход заболевания благополучный.

Штамм *A/Novosibirsk/KSH/2011(H1N1)pdm09 (KSH-2009)* (JQ041360.1, JQ041358.1, JQ041356.1, JQ041354.1, JQ041361.1, JQ041359.1, JQ041357.1, JQ041355.1) (второй пассаж на культуре клеток MDCK с титром вируса $6,8 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$), выделенный в январе 2011 года от мужчины 27 лет, не выезжавшего за границу. Исход заболевания благополучный.

Вирус гриппа птиц субтипа H5N1 *A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 (Krasn/05)* (номер Genbank EF205206.1, EF205199.1, EF205192.1, EF205157.1, EF205178.1, EF205171.1, EF205164.1, EF205185.1), который был выделен из лёгкого гуся, погибшего во время вспышки гриппа птиц в селе Красноозерское Новосибирской области в сентябре 2005 года (5-й пассаж на РКЭ с титром вируса $9,2 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$).

Экспериментальные животные. Эксперименты выполнены на лабораторных мышах инбредных линий (BALB/c и C57Bl/6z), а также на аутбредных мышах CD1.

Животных, полученных для проведения исследований, выдерживали на карантине 3 суток. В течение этого времени проводили осмотр на наличие у них признаков острых респираторных заболеваний (лихорадочные состояния, конъюнктивиты, качество шерстяного покрова).

Схемы экспериментов

Изучение адаптации пандемического вируса гриппа. С целью увеличения вирулентности пандемического ВГ А(H1N1)pdm09 были выполнены серийные

пассажи через лёгкие мышей 6-8-ми недельного возраста линии BALB/c (n=75), линии C57BL/6z (n=125) и беспородных мышей CD1 (n=105). По 10 шт. мышей каждой линии заражали интраназально 50 мкл физиологического раствора, содержащего 10^3 TCID_{50/ml} штамма *Tomsk/2010*. Всех животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды. По 7 шт. мышей из каждой группы были выбраны для ежедневного мониторинга признаков болезни, потери веса и летальности в течении 14 суток со дня инфицирования (д.и.). На третьи сутки после д.и. из каждой группы по 3 шт. мышей с наиболее выраженными симптомами заболевания умерщвляли путём дислокации шейных позвонков. Из их лёгких готовили 10%-ные гомогенаты на физиологическом растворе. После этого проводили интраназальное заражение новых групп мышей 10%-ми гомогенатами лёгких в объёме 50 мкл. Параллельно репликацию вируса в лёгких инфицированных мышей определяли титрованием 10%-го гомогената на культуре клеток MDCK. После получения 100% летальности в исследуемых группах были получены адаптированные варианты пандемического ВГ А(H1N1)pdm09 и определены значения LD₅₀ (WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, 2010). Группа отрицательного контроля каждой линии мышей (n=5) интраназально получала фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (рН 7.2) в объёме 50 мкл. Величину 50% летальной дозы для мышей рассчитывали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева по формуле: $\lg \text{TCID}_{50}/\text{ml} = \lg D_n - \delta(\sum L_i - 0,5)$ (И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев, 1962).

Для гистологического исследования от мышей линии BALB/c (n=3) на третьи сутки после инфицирования неадаптированным вариантом пандемического вируса гриппа (штамм *Tomsk/2010*) и после инфицирования адаптированным вариантом вируса гриппа (штамм *MA-BALB/c*) были взяты кусочки лёгкого, головного мозга, печени, почек и тонкого кишечника.

При перекрёстном инфицировании мыши линии BALB/c (n=10) были интраназально заражены штаммом *MA-C57Bl/6z* в дозе 10 ЛД₅₀ в объёме 50 мкл, а мыши линии C57BL/6z (n=10) – штаммом *MA-BALB/c* в дозе 10 ЛД₅₀ в

объёме 50 мкл. Группа отрицательного контроля каждой линии мышей (n=5) интраназально получала ФСБ (рН 7.2) в объёме 50 мкл.

Изучение биологических свойств штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших во время пандемии 2009 г. и в постпандемический период в 2011 г. на территории Сибири. С целью сравнения штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в пандемический и постпандемический периоды. В качестве экспериментальной модели были использованы мыши линии BALB/c (n=34) 8-ми недельного возраста. Первая группа мышей интраназально была инфицирована 50% мышинной инфекционной дозой (MID₅₀) штамма *N13-2009* в дозе 3,8 lgMID₅₀/мл в объёме 50 мкл. Вторая группа - *KSH-2011* в дозе 3,6 lgMID₅₀/мл в объёме 50 мкл. Группа отрицательного контроля каждой линии мышей (n=5) интраназально получала ФСБ (рН 7.2) в объёме 50 мкл. Наблюдение за животными проходило в течение 10 суток. На 1, 3, 6 и 10 сутки после заражения брали по 5 животных, у которых иссекали кусочки лёгкого и головного мозга для проведения вирусологического (ТЦИД₅₀), серологического (РГА, РТГА, МН), молекулярно-биологического (ПЦР real time, секвенирование последовательности геномов, филогенетический анализ) и светового (окраска гематоксилином и эозином) анализов.

Сравнительное исследование патогенности вирусов гриппа A/H5N1 и A(H1N1)pdm09 (неадаптированный и адаптированный варианты). С целью изучения степени патогенности субтипов вируса гриппа A/H5N1 и A/H1N1pdm09 (неадаптированный и адаптированный варианты) было проведено экспериментальное инфицирование лабораторных мышей линии BALB/c. Первая группа животных (n=24) была инфицирована штаммом *Krasn/05* в дозе 5 МЛД₅₀ в объёме 50 мкл инфицирующей жидкости. Вторая группа животных (n=12) была инфицирована MID₅₀ штаммом *Tomsk/2010* в дозе 6,38 lgТЦИД₅₀/мл в объёме 50 мкл инфицирующей жидкости. Третья группа животных (n=24) была инфицирована адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа штаммом *MA-BALB/c* в дозе 5 МЛД₅₀ в объёме 50 мкл инфицирующей жидкости. На 1-е, 3-и, 6-е и 10-е сутки после заражения животных выводили из

эксперимента путём дислокации шейных позвонков. Быстро извлеченные кусочки органов (лёгкое, головной мозг, печень, почка) подвергали вирусологическому анализу (TCID₅₀). Легкое и головной мозг также изучали с помощью светового (окраска гематоксилином и эозином, иммуногистохимическая окраска) и электронномикроскопического анализов.

Вирусологические методы исследования

Создание коллекции штаммов вируса гриппа А(H1N1)pdm09 субтипа.

Наработка пулов штаммов. Для длительного хранения проводили наработку пулов штамма на культуре клеток MDCK. Для этого использовали исходный вирусосодержащий биологический материал. Готовили его десятикратные разведения (1-10) на стерильном физиологическом растворе. Затем каждое разведение оценивали по продукции гемагглютинаина в РГА и 50% инфекционному титру на MDCK. Отобранные образцы с наибольшими показателями использовались для наработки пулов на 2-х культуральных флаконах по 10 мл объёма каждый. Общий пул получали путём объединения вирусосодержащей жидкости из двух культуральных флаконов, зараженных одинаковым разведением вируса. Вирусосодержащий раствор хранили при -70°C. Для каждого штамма заполнялся паспорт по форме патентного депонирования. После согласования с экспертной комиссией штаммы передавались в Коллекцию микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и в «Музей вирусов гриппа и ОРЗ» в ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ (г. Санкт-Петербург).

Лиофилизация штаммов вируса гриппа. Вирусосодержащую жидкость смешивали в пропорциях 1:1 с раствором САЖ (стабилизирующий раствор, содержащий 10 % сахарозы и 15% желатина). Далее этот вирусосодержащий раствор разливали в стеклянные ампулы объемом 3 мл и замораживали при -70 °С. Для лиофильного высушивания замороженные ампулы помещали в прибор Cryolizer B-64 (Freeze drying apparatus, New Brunswick Scientific Inc., NJ, USA) при рабочем давлении в вакуумной камере 6,6 Па. Лиофилизацию проводили в течение 24 ч при температуре -30 °С, после чего ампулы запаивали.

Каждую ампулу, содержащую лиофильно высушенный вирусосодержащий материал, маркировали этикеткой с указанием субтипа ВГ, названия штамма и даты лиофилизации. После лиофилизации для каждого штамма определяли инфекционность (TCID₅₀/мл) и титр в РГА. Содержимое ампулы разводили в 1мл ФСБ. Ампулы помещали на длительное хранение в камеру при температуре -20°C. Для каждого штамма заполнялся паспорт по форме патентного депонирования (Коллекция микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г.Новосибирск); Музей вирусов гриппа и ОРЗ ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ (г. Санкт-Петербург). После согласования с Постоянно действующей экспертной комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и экспертной комиссией Музея вирусов гриппа и ОРЗ ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ штаммы передавались в коллекции.

Сбор и хранение клинического материала.

Сбор и хранение мазков из носа и зева. Штамм N13-2009, штамм KSH-2011 и штамм Tomsk/2010 были из носоглоточных смывов от людей. Забор мазков из зева и носа осуществлялся в первые трое суток от начала заболевания стерильными вязкими тампонами на пластиковых аппликаторах. При взятии материала из носа тампон вводили последовательно в обе ноздри в область нижнего носового хода за пределы преддверия, после чего его погружали в пробирку с транспортной средой (среда для культур клеток Игла MEM с 0,5% бычьего сывороточного альбумина V фракция, 50 мкг/мл гентамицина и 2,5 мкг/мл амфотерицина В). Мазок из зева собирали аналогичным образом, плотно прижимая тампоны к пораженным гиперемизированным участкам миндалин и задней стенки глотки.

Транспортировка образцов осуществлялась в сосудах Дьюара с жидким азотом. Собранные образцы хранили до исследования при температуре не выше -70°C.

Сбор и хранение образцов сыворотки крови. Сыворотки крови людей, от которых был выделен вирус гриппа А(H1N1)pdm09 во время эпидемического сезона 2010-2011 гг., были предоставлены Новосибирской районной

больницей № 1. Кровь брали однократно на 21-28-е сутки от начала заболевания. Все пациенты, от которых получали кровь, не были вакцинированы от гриппа как минимум в течение последних двух сезонов. Сбор образцов крови осуществлялся методом случайной выборки у людей разных возрастных групп (18 лет и старше), обратившихся за медицинской помощью в многопрофильные лечебно-профилактические учреждения, а также на станциях переливания крови. Сбор образцов крови проводили в начале эпидемического сезона по гриппу и ОРВИ (октябрь – ноябрь) и после его окончания (март – апрель – май). Забор крови осуществлялся однократно из периферической (локтевой) вены в объеме 5 мл с помощью одноразовых шприцев или одноразовых пластиковых систем (вакутайнеры). Венозная кровь, полученная без антикоагулянтов, отстаивалась в пробирке при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка, затем пробирки помещали в холодильник на ночь. На следующий день отбирали сыворотку автоматической пипеткой в чистые пробирки и осветляли центрифугированием при 2000 – 3000 об/мин в течение 10 мин. Осветленную сыворотку отбирали пипеткой в чистую промаркированную пробирку.

Транспортировку образцов осуществляли в термоконтейнере с хладоэлементами. Собранные образцы хранили до исследования при температуре -20°C.

Выделение и культивирование вируса гриппа из секционного материала и клинических образцов. Выделение вируса гриппа из секционного материала (кусочки органов мышей: легкое, головной мозг, печень, почка, тонкая кишка), а также из клинических образцов (мазки из зева и носа) производили в культуре клеток MDCK. Для этого культивировали клетки MDCK на среде MEM (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург) с добавлением 10% сыворотки плодов коров («HyClone», Erembodegem, Бельгия), 100 Ед/мл бензилпенициллина, 50 мкг/мл гентамицина в атмосфере с 5%-содержанием CO₂ при 37°C. Клетки MDCK рассеивали на 96-луночные планшеты в количестве 3×10⁵ кл./мл.

По 100 мг экспериментальных образцов органов гомогенизировали в индивидуальной фарфоровой ступке с последующим добавлением 9мл раствора

Хенкса с добавлением антибиотиков. Суспензию осветляли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга «MiniSpin», Eppendorf), отбирали надосадочную жидкость, которую использовали для заражения клеток. Пробирки с клиническими образцами (мазки из носа и зева) центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин (центрифуга «MiniSpin», Eppendorf), отбирали надосадочную жидкость, которую использовали для заражения клеток. На суточный монослой культуры клеток MDCK наносили шесть последовательных 10-ти кратных разведений вируса. Ежедневно производили учет цитопатического действия вируса (ЦПД), проявляющегося в разрушении монослоя. Во всех лунках, где отмечалось ЦПД, реакция гемагглютинации была положительная. Значение 50% инфекционной дозы в тканевой культуре (50% tissue culture infectious dose - TCID₅₀) рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в виде $M \pm 2\sigma$, где M – среднее значение, σ – квадратичное отклонение.

Хранение вирусосодержащей культуральной жидкости осуществляли при температуре -70 °С.

Титрование вируса гриппа в культуре клеток MDCK. Титрование вируса гриппа в культуре клеток MDCK следующим образом: рассеивали клеточную суспензию на 96-луночные культуральные планшеты в концентрации 3×10^4 клеток/лунку. В качестве ростовой среды использовали питательную среду для культур клеток Игла-МЕМ с добавлением 10% фетальной сыворотки коров и раствора гентамицина сульфата в концентрации 50 мкг/мл. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°С в течение суток.

Готовили 10-кратные разведения имеющегося пула вируса на растворе Хенкса, начиная с разведения 10^{-1} . Планшеты с суточным монослоем клеток дважды отмывали раствором Хенкса и вносили разведения вируса в объёме 100 мкл в лунку, используя 6 лунок на разведение. Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе с температурой 37°С и подачей 5% CO₂ в течение 30 мин для адсорбции вируса, затем содержимое лунок удаляли и вносили в каждую лунку по 200 мкл поддерживающей среды. Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе с

температурой 37°C и подачей 5% CO₂. Ежедневно под микроскопом контролировали состояние монослоя клеток на наличие ЦПД. Окончательный учет титрования проводили на 7-е сутки.

Работы по определению их инфекционного титра вируса гриппа А/Н5N1 проводились с использованием РКЭ (ЭИД₅₀/мл).

Инфекционный титр вируса для культуры клеток MDCK (lgTCID₅₀/мл) и инфекционному титру на РКЭ (ЭИД₅₀/мл) рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в (И.П.Ашмарин, А.А.Воробьев, 1962).

Серологические методы исследования

Реакцию гемагглютинации (Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO, 2011).

Реакция гемагглютинации. В 96-луночном микропланшете готовили последовательные двукратные разведения тестируемой вируссодержащей жидкости (ВСЖ) фосфатно-солевым буфером (0,01M; pH 7,3 - 7,5 (БиолоТ). Конечный объем разведенной ВСЖ в каждой лунке составлял 50 мкл. Затем в каждую лунку вносили по 50 мкл суспензии эритроцитов гуся, смесь перемешивали пипетированием и инкубировали без перемешивания при +4°C в течение 30 мин. В шейкере или путём аккуратного встряхивания планшета перемешивали смесь эритроцитов и антигена. Планшеты инкубировали 30 - 40 минут и при 4°C до полного оседания эритроцитов в контрольных лунках. О наличии гемагглютинирующих агентов в образце культуральной жидкости судили по равномерной седиментации осадка эритроцитов на дне лунки. В этом случае РГА считали положительной (WHO, 2011). Наибольшее разведение культуральной жидкости, где РГА все еще была положительна, принимали за конечную точку титрования. При этом количество вируса гриппа, соответствующее конечной точке титрования, принимали за 1 гемагглютинирующую единицу (ГАЕ).

Реакция торможения гемагглютинации. Наличие в сыворотках антител к вирусу гриппа А(Н1N1) тестировали в реакции торможения гемагглютинации с

эритроцитами гуся. Перед работой все сыворотки были обработаны препаратом RDE (Denka Seiken), разрушающим неспецифические ингибиторы. Исследуемые сыворотки титровали двукратными разведениями на ФСБ (от 1:10 до 1:1280) в объеме 25 мкл. Для этого в первые лунки рядов вносили по 50 мкл сыворотки (имеющей уже исходное разведение 1:10 после обработки RDE и прогревания), в остальные лунки вносили по 25 мкл ФСБ. 25 мкл сыворотки из первой лунки переносили в следующую и после тщательного перемешивания процедуру повторяли. Затем к каждому разведению сыворотки добавляли по 25 мкл антигена, содержащих 4 ГАЕ. В каждую реакцию включали контрольную положительную сыворотку соответствующего субтипа и контрольную негативную сыворотку. На каждом планшете ставили контроль антигена (титрование используемого разведения антигена двукратными разведениями на ФСБ в 25 мкл) и контроль эритроцитов (50 мкл ФСБ). Планшеты встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. По завершении инкубации в каждую лунку, включая контрольные, добавляли по 50 мкл 1% суспензии эритроцитов гуся. Смесь перемешивали встряхиванием планшета и инкубировали при 4°C. Учет реакции проводили после полного оседания эритроцитов в контрольных лунках. Титром позитивной референс-сыворотки считали ее последнее разведение, обусловившее полное торможение гемагглютинации. При такой картине можно учитывать весь опыт типирования изолятов и полученные результаты считать достоверными. Сыворотки считали положительными, если обратный титр антител был равен или больше 1:40.

Реакция микронейтрализации. Двукратные разведения сывороток, предварительно прогретых 30 мин при 56°C, смешивали с 100 TCID₅₀/100 мкл вируса, выдерживали 1 час при 37°C в атмосфере 5% CO₂, затем вносили 1,5x10⁴ клеток MDCK, инкубировали 18-20 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂, после чего клетки фиксировали и в иммуноферментном анализе определяли в клетках наличие вирусного антигена. В качестве первичных антител использовали мышинные анти-NP моноклональные антитела (CDC), в качестве вторых – козы

анти-мышинные IgG, конъюгированные пероксидазой хрена (Sigma). Сыворотки считали положительными, если обратный титр антител был равен или больше 80.

Молекулярно-биологические методы исследования

Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Выделение РНК. Выделение РНК проводили с использованием набора «РИБО-сорб» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для этого в пробирки вносили по 450 мкл лизирующего раствора и по 10 мкл ВКО STI-рес, затем по 100 мкл исследуемого материала (мазки из носа и зева, вирусосодержащая культуральная жидкость). Инкубировали при комнатной температуре в течение 3-5 мин, после чего смесь перемешивали на вортексе и центрифугировали в течение 5 сек при 5000 об/мин. После этого в пробирки добавляли по 25 мкл тщательно ресуспендированного сорбента, дважды перемешивали на вортексе с перерывом в 1 мин и оставляли на 5 мин. Пробирки центрифугировали в течение 30 сек при 10000 об/мин, надосадочную жидкость удаляли. Далее проводили четырехкратную отмывку растворами для отмывки, после чего открытые пробирки помещали в термостат с температурой 60°C на 15 мин для подсушивания сорбента. В пробирки добавляли по 50 мкл РНК-буфера, перемешивали на вортексе, помещали в термостат с температурой 60°C на 2-3 мин, повторно перемешивали и центрифугировали в течение 1 мин при 12000 об/мин. Затем полученный раствор РНК переносили в чистую пробирку.

Реакция обратной транскрипции. Реакцию обратной транскрипции проводили сразу после получения РНК. Для получения кДНК вируса гриппа использовали набор «РЕВЕРТА-L» («АмплиСенс», Россия). Реакцию проводили в соответствии с протоколом производителя. Готовили реакционную смесь на 12 реакций: в пробирку с RT-mix вносили 5 мкл RT-G-mix-1, перемешивали на вортексе. К полученному раствору добавляли 6 мкл ревертазы, перемешивали. В предварительно подготовленные микропробирки вносили по 10 мкл реакционной

смеси и добавляли по 10 мкл РНК, перемешивая пипетированием. Пробирки помещали в амплификатор (термостат) при температуре 37°C на 30 мин.

ПЦР-амплификация в режиме реального времени и детекция продуктов ПЦР-амплификации. Для амплификации генов вируса гриппа был использован набор реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» («АмплиСенс», Россия). Реакция проводилась в соответствии с протоколом производителя. Брали необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб, на поверхность воска вносили по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL. В подготовленные таким образом пробирки вносили по 10 мкл кДНК. Ставили необходимые контрольные реакции.

Амплификацию проводили в приборе Rotor-Gene 6000. Результат амплификации считали достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения РНК. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Секвенирование генома.

Определение нуклеотидных последовательностей ДНК для штаммов *N13-2009* и *KSH-2011* определяли с помощью секвенирующей реакции, используя коммерческий набор BigDye Terminator 3.1v Cycler (Applied Biosystem, США) согласно протоколу производителя.

Секвенирующую реакцию проводили с праймерами M13 (M13-F 5'-TGTAACGACGGCCAGT - 3'; M13-R 5'-CAGGAAACAGCTATGACC - 3') (E. Ghedin et al., 2005). Реакцию осуществляли в следующем температурном режиме:

| Стадия | Температура, °C | Время | Количество циклов |
|-----------------------|-----------------|--------|-------------------|
| Начальная денатурация | 95 | 2 мин | 1 цикл |
| Денатурация | 94 | 30 сек | 40 циклов |
| Отжиг праймеров | 50 | 20 сек | |
| Элонгация | 60 | 4 мин | |

Очистку секвенирующей реакции производили коммерческим набором BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystem, США) согласно протоколу производителя. Для этого в пробирку с секвенирующей реакцией добавляли 40 мкл SAM Solution и 10 мкл XTerminator Solution. Содержимое пробирок перемешивали в шейкере в течение 30 мин при 1400 об/мин. Затем пробирки центрифугировали 2 мин при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость в объеме 15 мкл переносили в планшет MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystem, США).

Определение первичных последовательностей осуществляли в автоматическом анализаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США) согласно инструкции производителя.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием специализированного программного обеспечения: Vector NTI Advance 10 (Invitrogen), SeqMan (Lasergene) и специализированных ресурсов Influenza Virus Resource (Bao Y., P. Bolotov, D. Dernovoy, B. Kiryutin, L. Zaslavsky, T. Tatusova, J. Ostell, and D. Lipman. The Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology Information // J. Virol. 2008. 82(2). P. 596-601) и BLAST (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine). Анализ аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программы BioEdit.

Определение нуклеотидных последовательностей ДНК штамма *Tomsk/2010* и его адаптированных вариантов (*MA-BALB/c*, *MA-C57Bl/6z*, *MA-CD1*) проводили по следующей методике.

Суммарная РНК была выделена из 100 мкл вирусодержащей жидкости с использованием реагента РИБО-сорб по методике, описанной выше.

Для получения ДНК библиотек из дцДНК использовали набор «TruSeq DNA Sample Prep Kits v2» (Illumina, США) в соответствии с инструкцией. Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза «QIAxcel Advanced System» (QIAGEN, Германия). Измерение молярности полученных библиотек проводили методом ПЦР в реальном времени (2x SsoFast

EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США), прибор Bio-Rad CFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве «Sequencing Library qPCR Quantification Guide» (Illumina, США). Секвенирование ДНК-библиотек проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора «MiSeq Reagent Kits V2 (300PE)» в соответствии с инструкцией производителя.

Биоинформационный анализ. Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование ридов проводили с использованием программы Vector NTI v11.

Филогенетический анализ. Филогенетические деревья выровненных нуклеотидных последовательностей строили с помощью программы MEGA v5.3. методом «максимального правдоподобия (n=1000) (Maximum-Likelihood, ML)» (N. Saitou, 1990). Для исследования достоверности локальной топологии в филогенетических деревьях использовали метод обычного (непараметрического) бутстрепа (N. Saitou, 1990). Значение индекса бутстреп >75% для узла дерева считали признаком достоверности монофилии клады, для которой данный узел является наиболее близким общим предком.

Морфологические методы исследования

Гистологическое исследование. Органы (лёгкое, головной мозг, печень, почка и тонкая кишка), выделенные от инбредных мышей линии BALB/c, фиксировали в 4 % растворе формалина, затем обезвоживали по стандартной методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм получали с помощью ротационного микротомы HM 340E («Carl Zeiss», Германия), окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори, по Браше, по Ван-Гизону. Светооптическое исследование и микрофотосъёмку проводили на микроскопе Axioskop 40 («Carl Zeiss», Германия).

Морфометрический анализ структур лёгких, головного мозга, печени, почек и тонкой кишки проводили на парафиновых срезах. Определяли величины следующих морфометрических параметров: в головном мозге: среднее количество клеток "теней", диаметр кровеносных сосудов; в печени – диаметры

синусоидных капилляров, среднюю величину гепатоцитов; в почке - диаметр собирательных трубочек и почечных клубочков; в тонкой кишке - среднее количество бокаловидных клеток на поле зрения и высоту каёмчатых клеток эпителиального слоя. Морфометрический обсчет клеток был выполнен в поле зрения при окуляре 10x/25 и объективе 100x/1,3 oil.

Иммуногистохимический метод. Образцы лёгких, головного мозга, печени, почек и тонкой кишки для исследования получали через 3 суток после заражения от 3-х мышей на каждом сроке каждой группы (первая группа служила контролем, вторая группа была инфицирована штаммом *Tomsk/2010*, третья группа – штаммом *MA-BALB/c*. Парафиновые срезы толщиной 3-4 мкм подвергали депарафинизации, регидратации, демаскировке антигенов в микроволновой печи мощностью 700W, в течение 20-25 минут. Затем, после однократной промывки в дистиллированной воде и фосфатно-солевом буфере, блокировали эндогенную пероксидазу в течение 5 минут. Время экспозиции с первичными антителами к NP белку, что подтверждает процесс репликации ВГА в исследуемом органе, составило 60 минут при комнатной температуре в 37°C. Затем срезы инкубировали со стрептавидин-пероксидазным комплексом, DAB-субстратом и дополнительно докрасивали гематоксилином Майера. После проводили по спиртам возрастающей концентрации и ксилолам, покрывали синтетической покровной средой «Bio Mount» (Bio Vitrum) и заключали под покровное стекло.

Электронно-микроскопическое исследование. Образцы лёгких и головного мозга для исследования получали через 1, 3 и 6 сутки после заражения от 3-х мышей на каждом сроке каждой группы (первая группа служила контролем, вторая группа была инфицирована штаммом *Tomsk/2010*, третья группа – штаммом *MA-BALB/c*. Животных выводили из эксперимента путём дислокации позвонков в шейном отделе. Кусочки быстро иссеченных органов фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере pH 7,4, в течение 4 ч при температуре 4°C, дофиксировали в 1% растворе четырехокиси осмия, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (50°, 70°, 96°,

абсолютный), смеси ацетона и абсолютного спирта и завершали проводку в ацетоне. Образцы органов заливали в смесь аралдита-эпона (1:6) с добавлением катализатора DMP-30, полимеризацию проводили сначала при комнатной температуре, далее в термостате при 60°C. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме UC-6 (пр-во Leica, Германия). Полутонкие срезы окрашивали 1% раствором метиленового синего и использовали для ориентировки на срезе при затачивании пирамидки. Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным раствором уранилацетата и раствором Рейнольдса и изучали в электронном микроскопе Libra 120 Carl Zeiss (Германия) при ускоряющем напряжении 80 kV в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН ИЦиГ.

Статистический анализ. Определение статистической достоверности различий вирусных титров и морфометрических параметров в сравниваемых группах проводили методами вариационной статистики. Вероятность достоверности различий сравниваемых средних величин оценивали по t-критерию Стьюдента, достоверными считали различия при $p < 0,05$ (А.Т. Усович, П.Т. Лебедев, 1970; Г.Г. Автандилов, 2002).

ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Изучение адаптации пандемического вируса гриппа

В естественных условиях ВГ A(H1N1)pdm09 не вызывает инфекционного процесса у мышей. Тем не менее, большинство лабораторных мышей используется в экспериментах в качестве модельных животных для изучения патогенеза заболевания гриппом у млекопитающих. Обычно у экспериментальных животных при инфицировании вирусами гриппа развивается клинически выраженная гриппозная инфекция респираторного тракта без летального исхода (Ware, 2000; Rolling, 2009). Однако неадаптированный вирус способен реплицироваться в лёгких, бронхах и трахеи, что способствует увеличению вирусного титра и его адаптации к организму при пассировании через лёгкие мышей (Киселев и Львов 2012; Pyushina et al., 2010; Xu et al., 2011; McHugh et al., 2013).

Получение адаптированных вариантов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на экспериментальных моделях животных. С целью увеличения вирулентности дикого типа пандемического вируса гриппа на примере штамма *Tomsk/2010*, выделенного от человека в январе 2010 года, была проведена адаптация вируса гриппа путём пассирования через лёгкие лабораторных животных (инбредные мыши линии BALB/c и C57BL/6z, аутбредные мыши CD1). Клинические симптомы гриппозной инфекции в виде снижения аппетита и веса тела, взъерошенности шерсти, сгорбленной осанки регистрировали в группе мышей линии BALB/c с 2-го пассажа, в группе мышей линии C57BL/6z с 5-го пассажа, в группе мышей CD1 - с 3-го пассажа (Таблица 4). Первые летальные случаи были зарегистрированы в 4-ом пассаже среди мышей линии BALB/c, в 8-ом – среди мышей линии C57BL/6z и в 5-ом пассаже – среди мышей CD1 (Таблица 5, Рисунок 5). 100%-летальность была

получена к 7 пассажу в группе мышей линии BALB/c, к 12 пассажу в группе мышей линии C57BL/6z и в группе мышей CD1 – к 10-му пассажу (Рисунок 5). Значения вирусных титров составили: для штамма дикого типа *Tomsk/2010* - $5,6 \pm 0,60 \text{ lgTCID}_{50}/\text{ml}$, для штамма *MA-BALB/c* - $5,0 \pm 0,50 \text{ lgTCID}_{50}/\text{ml}$, для штамма *MA-C57Bl/6z* – $5,4 \pm 0,50 \text{ lgTCID}_{50}/\text{ml}$, для штамма *MA-CD1* - $7,5 \pm 0,35 \text{ lgTCID}_{50}/\text{ml}$ (Рисунок 6А, 6Б). В процессе вирусной адаптации во всех группах экспериментальных животных отмечалось нарастание инфекционного титра вируса с третьего пассажа, что говорит об увеличении вирусной продукции в лёгких экспериментальных животных (Рисунок 6, Таблица 5). Достоверные отличия вирусных титров по сравнению с контролем зарегистрированы в группе мышей линии BALB/c в пятом пассаже ($5,3 \pm 0,40 \text{ lgTCID}_{50}/\text{ml}$), в группе мышей линии C57BL/6z во втором ($4,8 \pm 0,60 \text{ lgTCID}_{50}/\text{ml}$) - четвёртом ($4,9 \pm 0,40 \text{ lgTCID}_{50}/\text{ml}$), пятом ($5,5 \pm 0,40 \text{ lgTCID}_{50}/\text{ml}$), шестом ($4,6 \pm 0,20 \text{ lgTCID}_{50}/\text{ml}$), седьмом ($5,8 \pm 0,40 \text{ lgTCID}_{50}/\text{ml}$) и в одиннадцатом ($4,6 \pm 0,20 \text{ lgTCID}_{50}/\text{ml}$) пассажах, а в группе мышей CD1 достоверных различий не обнаружено (Таблица 5, Таблица 6, Рисунок 6). Значения 50% летальной дозы (LD_{50}) для мышей линии BALB/c оказались наименьшими, по сравнению со значением LD_{50} для мышей линии C57BL/6z и мышей CD1, что свидетельствует о бóльшей степени патогенности штамма *MA-BALB/c* (Таблица 6). Результаты реакции гемагглютинации значимых различий в группах по отношению с контролем не выявили (Таблица 6).

Таким образом, проведённый анализ показал, что пандемический вирус гриппа A(H1N1)pdm09 при благоприятных для себя условиях способен быстро адаптироваться к той популяции животных, в которой он циркулирует, вызывая 100% летальность.

Таблица 4. Процесс адаптации пандемического штамма *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09) (Tomsk/2010)* путём пассирования через лёгкие экспериментальных мышей.

| Инбредные мыши | | | | | | Аутбредные мыши | | |
|----------------|--------------|----------------------|----------------|--------------|----------------------|-----------------|--------------|----------------------|
| Линия BALB/c | | | Линия C57Bl/6z | | | CD1 | | |
| Пассажи | Смертность % | Клинические симптомы | Пассажи | Смертность % | Клинические симптомы | Пассажи | Смертность % | Клинические симптомы |
| контроль | 0 | - | контроль | 0 | - | контроль | 0 | |
| МА-1 | 0 | - | МА-1 | 0 | - | МА-1 | 0 | - |
| МА-2 | 0 | + | МА-2 | 0 | - | МА-2 | 0 | - |
| МА-3 | 0 | +++ | МА-3 | 0 | - | МА-3 | 0 | + |
| МА-4 | 2/10 | ++++ | МА-4 | 0 | - | МА-4 | 0 | +++ |
| МА-5 | 6/10 | +++++ | МА-5 | 0 | + | МА-5 | 3/10 | +++++ |
| МА-6 | 7/10 | +++++ | МА-6 | 0 | + | МА-6 | 8/10 | +++++ |
| МА-7 | 10/10 | +++++ | МА-7 | 0 | ++ | МА-7 | 8/10 | +++++ |
| | | | МА-8 | 2/10 | +++ | МА-8 | 8/10 | +++++ |
| | | | МА-9 | 2/10 | ++++ | МА-9 | 9/10 | +++++ |
| | | | МА-10 | 4/10 | +++++ | МА-10 | 10/10 | +++++ |
| | | | МА-11 | 9/10 | +++++ | | | |
| | | | МА-12 | 10/10 | +++++ | | | |

Примечание: МА – адаптированный к организму мышей штамм *Tomsk/2010*, прошедший через лёгкие мышей линии BALB/c 7 пассажей, через лёгкие мышей линии C57Bl/6z 12 пассажей, а через лёгкие мышей CD1 10 пассажей. + изменения шёрстного покрова; ++ изменения шёрстного покрова, сгорбленная осанка; +++ изменения шёрстного покрова, сгорбленная осанка, снижение аппетита; ++++ изменения шёрстного покрова, сгорбленная осанка, снижение аппетита, животные сбиваются в кучу; +++++ изменения шёрстного покрова, сгорбленная осанка, животные сбиваются в кучу, снижение аппетита и веса тела, усиленное брюшное дыхание, у некоторых мышей отмечается конъюнктивит.

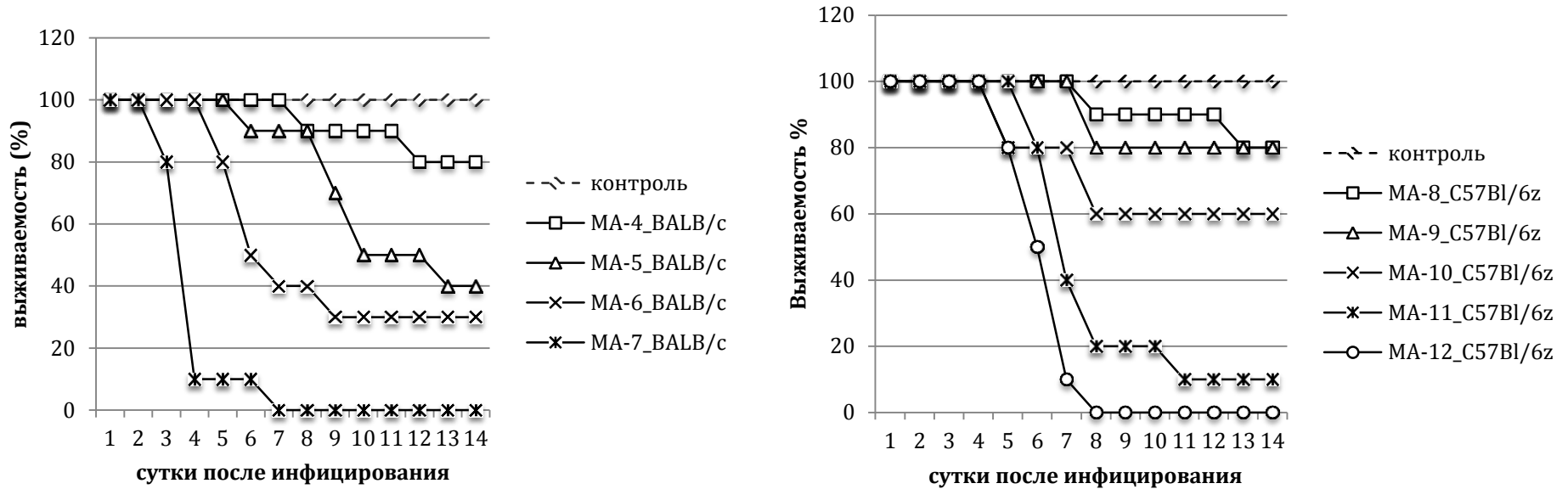
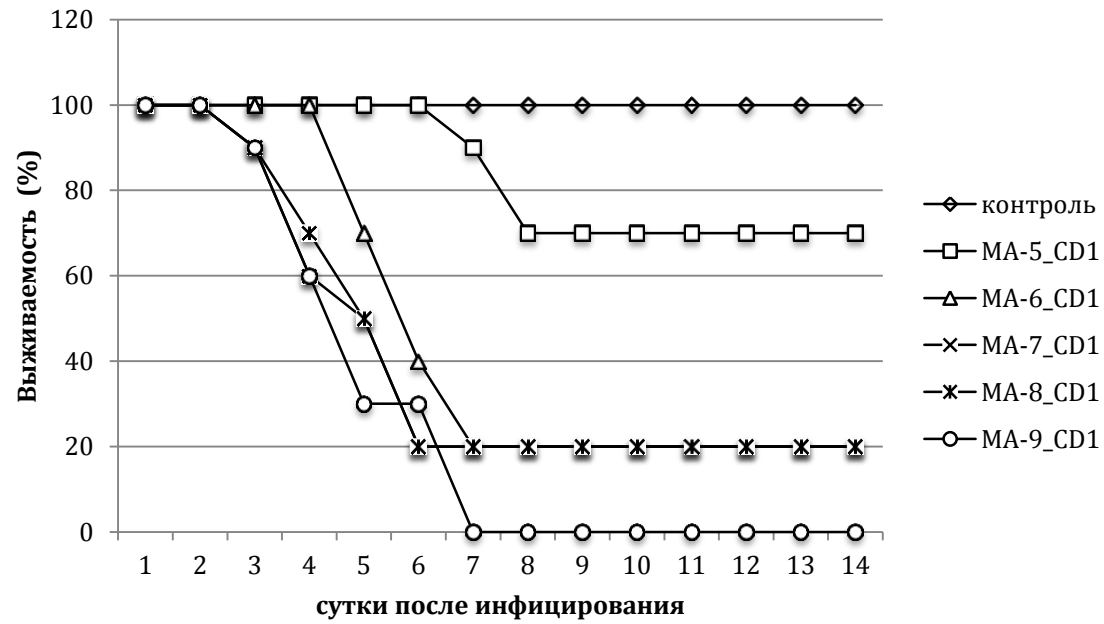


Рисунок 5. Патогенность адаптированного вируса гриппа A(H1N1)pdm09 для экспериментальных мышей.

Примечание: контроль - это группа мышей каждой линии (n=5), которые интраназально получали ФСБ (рН 7.2) в объёме 50 мкл. Группы мышей линии BALB/c (n=10), C57Bl6/z (n=10) и CD1 (n=10) в первом пассаже были интраназально инфицированы пандемическим штаммом *Tomsk/2010*, выделенным от человека (второй пассаж на культуре клеток MDCK с титром вируса 5,6 lgTCID_{50/ml}). По 7 шт. мышей из каждой группы были отобраны для мониторинга клинических признаков гриппозного заболевания в течение 14 суток, а оставшиеся 3 шт. мышей в каждой группе были выведены из эксперимента на 3 сутки после инфицирования для определения вирусной РНК, титра вируса, ГАЕ, проведения гистологического исследования лёгких и приготовления 10% гомогената лёгкого с целью проведения следующего пассажа по принятой схеме. МА – адаптированный к мышам штамм *Tomsk/2010*, прошедший через лёгкие мышей линии BALB/c 7 пассажей, через лёгкие мышей C57Bl/6z 12 пассажей, а через легкие мышей CD1 10 пассажей.

продолжение рисунка 5. Патогенность адаптированного вируса гриппа А(Н1N1)рdm09 для экспериментальных мышей.



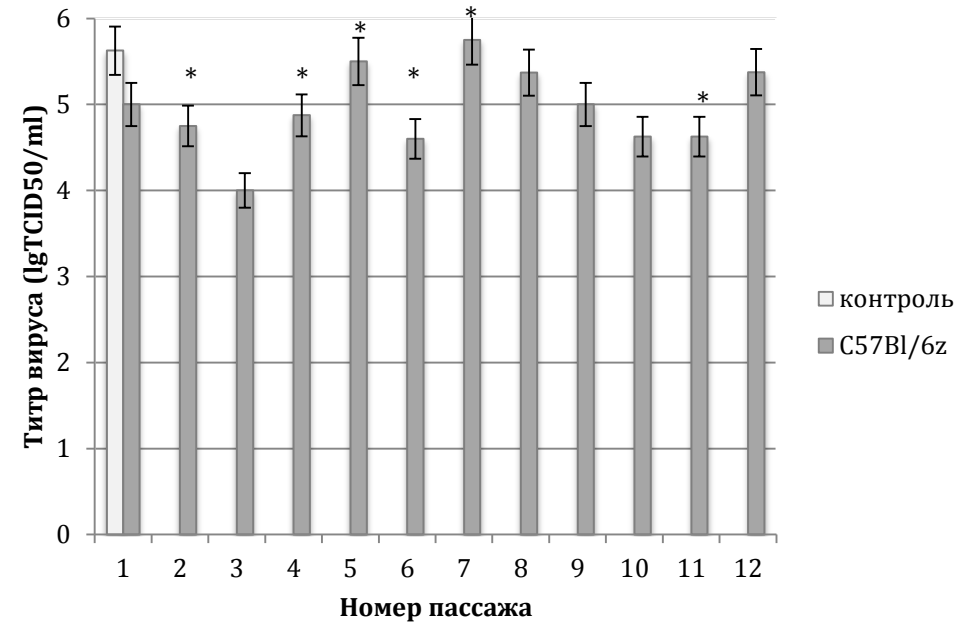
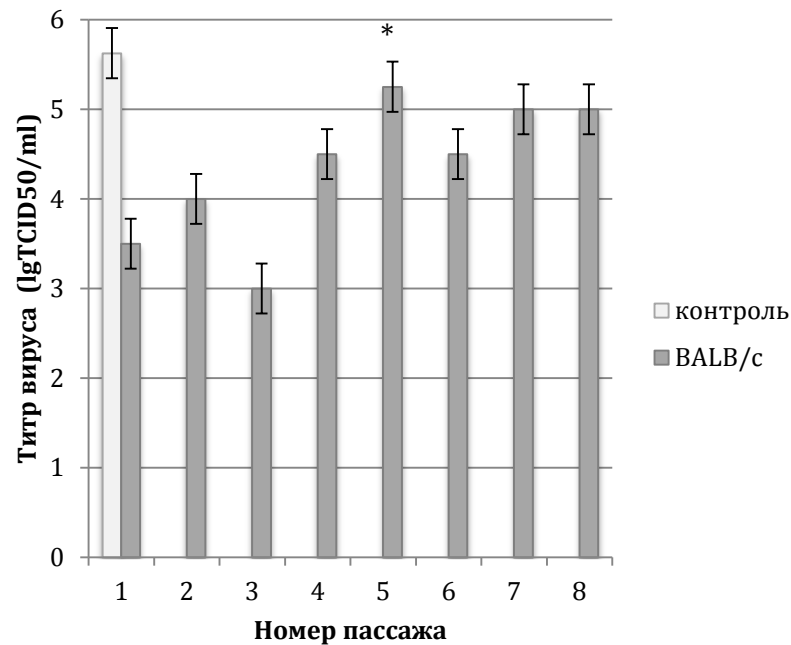


Рисунок 6. Вирусологические показатели титра вируса гриппа А штамма *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)* (*Tomsk/2010*) на разных пассажах во время адаптации через лёгкие инбредных мышей линии BALB/c, C57Bl/6z и аутбредных мышей CD1 (данные представлены на графике).

Примечание: титры вируса в лёгких мышей линии BALB/c и C57Bl/6z, а также аутбредных мышей CD1 были определены с помощью культуры клеток MDCK и выражены в lgTCID₅₀ на 1мл исследуемого образца, в виде $M \pm I95$, где M - средняя арифметическая величина, а I95 – доверительный интервал. * - $P < 0,05$ при сравнении титра вируса в экспериментальной группе по отношению к контролю (t-критерий Стьюдента). Контроль - это доза вируса гриппа А(H1N1)pdm09 штамм *Tomsk/2010*, посчитанная на культуре клеток MDCK при выделении изолята от человека.

продолжение рисунка 6. Вирусологические показатели титра вируса гриппа А штамма А/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09) на разных пассажах во время адаптации через лёгкие инбредных мышей линии BALB/c, C57Bl/6z и аутбредных мышей CD1.

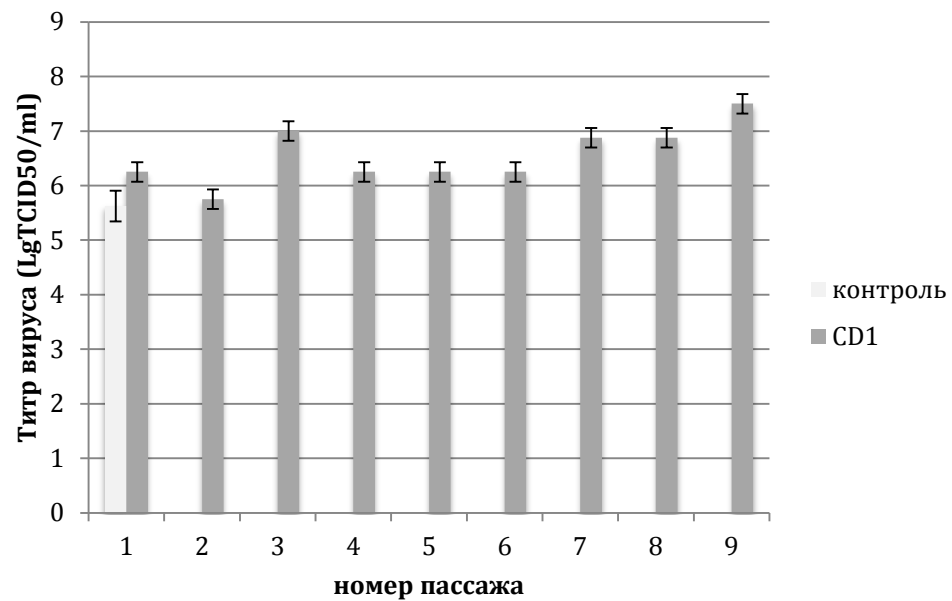


Таблица 5. Вирусологические показатели титра вируса гриппа А штамма Tomsk/2010 на разных пассажах во время адаптации через лёгкие инбредных мышей линии BALB/c, C57Bl/6z и аутбредных мышей CD1 (данные представлены в таблице).

| Штаммы, адаптированные к инбредным мышам | | | | Штаммы, адаптированные к аутбредным мышам | |
|--|---|-------------|---|---|---|
| МА-BALB/c | | МА-C57Bl/6z | | МА-CD1 | |
| Пассажи | Титр вируса (lgTCID ₅₀ /мл) ¹ | Пассажи | Титр вируса (lgTCID ₅₀ /мл) ¹ | Пассажи | Титр вируса (lgTCID ₅₀ /мл) ¹ |
| контроль | 5,6±0,60 | контроль | 5,6±0,60 | контроль | 5,6±0,60 |
| МА-1 | 3,5±1,00 | МА-1 | 4,0±0,50 | МА-1 | 6,3±0,44 |
| МА-2 | 4,0±0,50 | МА-2 | 4,8±0,75* | МА-2 | 5,8±0,60 |
| МА-3 | 3,0±0,50 | МА-3 | 4,0±0,50 | МА-3 | 7,0±0,50 |
| МА-4 | 4,5±0,62 | МА-4 | 4,9±0,34* | МА-4 | 6,3±0,66 |
| МА-5 | 5,3±0,44* | МА-5 | 5,5±0,32* | МА-5 | 6,3±0,60 |
| МА-6 | 5,5±0,79 | МА-6 | 4,6±0,22* | МА-6 | 6,3±0,44 |
| МА-7 | 5,0±0,50 | МА-7 | 5,8±0,30* | МА-7 | 6,9±0,12 |
| | | МА-8 | 5,4±0,23 | МА-8 | 6,9±0,20 |
| | | МА-9 | 5,0 ±0,41 | МА-9 | 7,5±0,44 |
| | | МА-10 | 4,6±0,38 | МА-10 | 7,5±0,35 |
| | | МА-11 | 4,6±0,23* | | |
| | | МА-12 | 5,4±0,54 | | |

Примечание: 1-титры вируса в лёгких инбредных мышей линии BALB/c и C57Bl6/z, а также аутбредных мышей CD1 были определены с помощью культуры клеток MDCK и выражены в lgTCID₅₀ на 1мл исследуемого образца, в виде $M \pm I95$, где M - средняя арифметическая величина, а I – доверительный интервал.* - $P < 0,05$ при сравнение титра вируса в экспериментальной группе по отношению к группе контроля (t-критерий Стьюдента). Контроль - это доза вируса гриппа A(H1N1)pdm09 штамм Tomsk/2010, посчитанная на культуре клеток MDCK при выделении изолята от человека.

Таблица 6 - Вирусологические характеристики пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и его адаптированных вариантов к инбредным мышам линии BALB/c, C57Bl/6z и аутбредным мышам CD1

| Название штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 | Титр вируса в лёгких мышей ¹ | ГАЕ ² | ЛД ₅₀ ³ | ЛД ₅₀ , выраженная в lgTCID ₅₀ /мл |
|---|---|------------------|-------------------------------|--|
| Tomsk/2010 | 5,6±0,60 | 2560 | - | - |
| МА-BALB/c | 5,0±0,50 | 2560 | 10 ^{-3,8} | 1,2 |
| МА-C57Bl/6z | 5,4±0,50 | 1280 | 10 ^{-1,9} | 3,5 |
| МА-CD1 | 7,5±0,35 | 1280 | 10 ^{-2,5} | 5,0 |

Примечание: ¹ - титры вирусов выражены в lgTCID₅₀ на 1мл исследуемого образца в виде $M \pm I95$, где M - средняя арифметическая величина, а I – доверительный интервал; ² - гемагглютинирующая единица в 1мл исследуемого образца; ³ – 50%-ная летальная доза для мышей в 1 мл на 1 г веса животного.

Изучение аминокислотных последовательностей белков дикого штамма пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и его адаптированных вариантов к лабораторным мышам. Анализ аминокислотных последовательностей всех белков у дикого штамма *Tomsk/2010* и у его адаптированных вариантов (штамм *MA-BALB/c*, штамм *MA-C57Bl/6z* и штамм *MA-CD1*) показал различия по шести белкам HA, NA, NP, NS2, PB2, PB1 и наличие потенциальной экспрессии факультативного неструктурного белка PB1-F2 (Таблица 7). Аминокислотные (а.к.) замены в белке HA отмечены в антигенных сайтах: (Sa) E172G, (Ca2) G239D; в белке NA: I357V, L443I, T367I, при этом во всех исследуемых штаммах обнаружено закрепление главных не синонимичных замен – 106I, 248D (не показано в таблице), характерных для ВГ A(H1N1)pdm09, циркулирующих во второй половине пандемии. С помощью анализа литературных источников были выявлены аминокислотные замены, отвечающие за усиление патогенности, адаптацию к животным, а также за лекарственную устойчивость у адаптированных вариантов пандемического ВГ A(H1N1)pdm09.

Обнаруженные аминокислотные замены:

1. в белке PB2:

- G158E обнаружена у двух штаммов - *MA-BALB/c* и *MA-C57Bl/6z*. По данным литературы мутация E158G значительно увеличивает транскрипционную и репликативную активность у адаптированного варианта вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к мышам (Pyushina et al., 2010)
- T271A (присутствует у всех исследуемых штаммов) увеличивает полимеразную активность в клетках животных (Fukuyama and Kawaoka, 2011; Liu et al., 2012);
- T271A+590S/591R (присутствует у всех исследуемых штаммов) - данное сочетание а.к. замен отвечает за эффективную репликацию

и адаптацию ВГ A(H1N1)pdm09 у млекопитающих (Fukuyama and Kawaoka, 2011; Liu et al., 2012).

- S317L + R482K + T689A + I690V - а.к. замены, обнаруженные у всех адаптированных вариантов пандемического ВГ по отношению к дикому штамму. Литературных данных по перечисленным мутациям не найдено.

2. в белке PA:

- 295P - (присутствует у всех исследуемых штаммов) известно, что данная аминокислота в сочетании с HA (K154Q) была результатом селекции вируса с улучшенной репликацией и вирулентностью при изучении адаптации пандемического вируса A(H1N1)pdm09 на хорьковой модели (Pyushina et al., 2010).

3. белок PB1-F2:

- Q19 (у штаммов - *MA-BALB/c*, *MA-C57Bl/6z* и *MA-CD1*) - возможность потенциальной экспрессии факультативного неструктурного белка PB1-F2.

4. в белке HA:

- 100I - увеличивает вирусную трансмиссию (Giria et al., 2012; Ye et al., 2010).
- E172G и G239D - обнаружены у двух штаммов - *MA-BALB/c* и *MA-C57Bl/6z*. Литературных данных по перечисленным мутациям не найдено.

5. в белке NP:

- E119V (присутствует у всех исследуемых штаммов) отвечает за лекарственную устойчивость к занамивиру (Giria et al., 2012; Song et al., 2013).
- N375D - обнаружена у двух штаммов - *MA-BALB/c* и *MA-C57Bl/6z*. Литературных данных о данной мутации не найдено.

6. в белке NA:

- V106I - (присутствует у всех исследуемых штаммов) чувствительность ВГА к озельтамивиру (Giria et al., 2012);
- N248D - одна из главных несинонимичных замен, характерных для ВГ A(H1N1)pdm09. Отмечена чувствительность к озельтамивиру (Morlighem et al., 2011; Giria et al., 2012);
- I357V + L443I + T467I - а.к. замены, обнаруженные у всех адаптированных вариантов пандемического ВГ по отношению к дикому штамму. Литературных данных по перечисленным мутациям не найдено.

7. в белке NS1:

- I123V - (присутствует у всех исследуемых штаммов) предполагается, что данная замена играет роль в адаптации ВГ A(H1N1)pdm09 к человеку и усилении вирулентности. Данная а.к. расположена в эффекторном домене и функциональном районе, регулирующем апоптоз клеток хозяина (Pan et al., 2010).

7. в белке NS2:

- M235V и A236V а.к. замены, обнаруженные у всех адаптированных вариантов пандемического ВГ по отношению к дикому штамму. Литературных данных по перечисленным мутациям не найдено.

При сравнении дикого штамма ВГ A(H1N1)pdm09 и его адаптированных вариантов не было выявлено различий по аминокислотному составу белков M2, M1, PA и PA-X.

Сравнительный анализ аминокислотного состава адаптированных вариантов пандемического ВГ A(H1N1)pdm09 выявил различия между тремя штаммами, которые являются вероятной причиной функциональных различий патогенов:

1. в белке PB2:

- E158G - выявлена только у штамма *MA-CD1*. По-мнению N.A. Plyushina и др. данная мутация значительно увеличивает транскрипционную и репликативную активность у адаптированного варианта вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к мышам (Plyushina et al., 2010). Однако, данная а.к. замена изначально была у дикого штамма и, вероятно, в нашем эксперименте существенного влияния на скорость адаптации штамма *MA-CD1* к животным не повлияла;
- S279F - данная а.к. замена выявлена только у штамма *MA-C57Bl/6z* и является единственным различием со штаммом *MA-BALB/c*. По данным международной базы FLUSURVER обнаруженная мутация является крайне редкой, её функциональное значение не выявлено (<http://flusurver.bii.a-star.edu.sg>);

2. в белке HA:

- G155E+D222G данное сочетание мутаций также выявлено только у штамма *MA-CD1*, и по данным литературы возникает в результате адаптации ВГ A(H1N1)pdm09 к мышам (Plyushina et al., 2010);
- D239G - выявлена только у штамма *MA-CD1*. Однако, данная а.к. замена изначально была у дикого штамма и, вероятно, в нашем эксперименте существенного влияния на скорость адаптации данного патогена к животным не повлияла;

3. в белке NP:

- D375N - выявлена только у штамма *MA-CD1*. Однако, данная а.к. замена изначально была у дикого штамма и, вероятно, в нашем эксперименте существенного влияния на скорость адаптации патогена к животным не повлияла. В международной базе данных информации о такой мутации на настоящий момент нет.

Таким образом, мы обнаружили, что увеличение патогенности адаптированных вариантов сопровождалось 19 аминокислотными заменами в

белках HA, NA, NS2 и в белках рибонуклепротеинового комплекса PB1, PB2, NP, а также возникновением потенциальной экспрессии факультативного неструктурного белка PB1-F2 (Q19). Наиболее близкими по аминокислотному составу оказались штаммы *MA-BALB/c* и *MA-C57Bl/6z*.

Таблица 7. Аминокислотные отличия пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 и его адаптированных вариантов к мышам инбредных линий BALB/c, C57Bl6/z и аутбредной линии CD1

| Название штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 | PB2 | | | | | | PB1 | | | | PB1-F2 | HA Antigenic site | | NP | NA | | | NS2 | |
|---|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-------------------|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 158 | 279 | 317 | 482 | 689 | 690 | 50 | 233 | 586 | 605 | | Sa | Ca2 | | 375 | 357 | 443 | 467 | 235 |
| | Tomsk/2010 | G | S | S | R | T | I | L | S | R | P | - | E | G | N | I | L | T | M |
| МА-BALB/c | E | S | L | K | A | V | S | R | K | H | Q | G | D | D | V | I | I | V | V |
| МА-C57Bl/6z | E | F | L | K | A | V | S | R | K | H | Q | G | D | D | V | I | I | V | V |
| МА-CD1 | G | S | L | K | A | V | S | R | K | H | Q | E | G | N | V | I | I | V | V |

Примечание: штамм *Tomsk/2010* изначально был выделен от человека, а затем адаптирован к мышам различных генотипов (BALB/c, C57Bl/6z, CD1); Адаптированные варианты: штамм *МА-BALB/c* прошедший через лёгкие мышей линии BALB/c 7 пассажей; штамм *МА-C57Bl/6z* - 12 пассажей через лёгкие мышей C57Bl/6z; штамм *МА-CD1* - 10 пассажей через лёгкие мышей CD1.

Изучение степени патогенности адаптированного варианта пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 при заражении другой генетической линии лабораторных мышей. Для изучения внутривидовой изменчивости по устойчивости к адаптированному варианту пандемического ВГ A(H1N1)pdm09 было проведено перекрёстное инфицирование мышей двух различных генетических линий. Мышей линии BALB/c интраназально инфицировали штаммом, адаптированным к мышам линии C57Bl/6z, а мышей линии C57Bl/6z - штаммом, адаптированным к мышам линии BALB/c. Вирусологический анализ штамма MA-BALB/c, полученного путём адаптации к мышам линии BALB/c, выявил его высокую летальность для группы мышей линии C57Bl/6z – к 9-м суткам эксперимента смертность животных составила 100% (Рисунок 7). В то же время штамм MA-C57Bl/6z, адаптированный к мышам линии C57Bl/6z, проявил слабые патогенные свойства по отношению к мышам линии BALB/c, не вызывая летальных случаев (Рисунок 7).

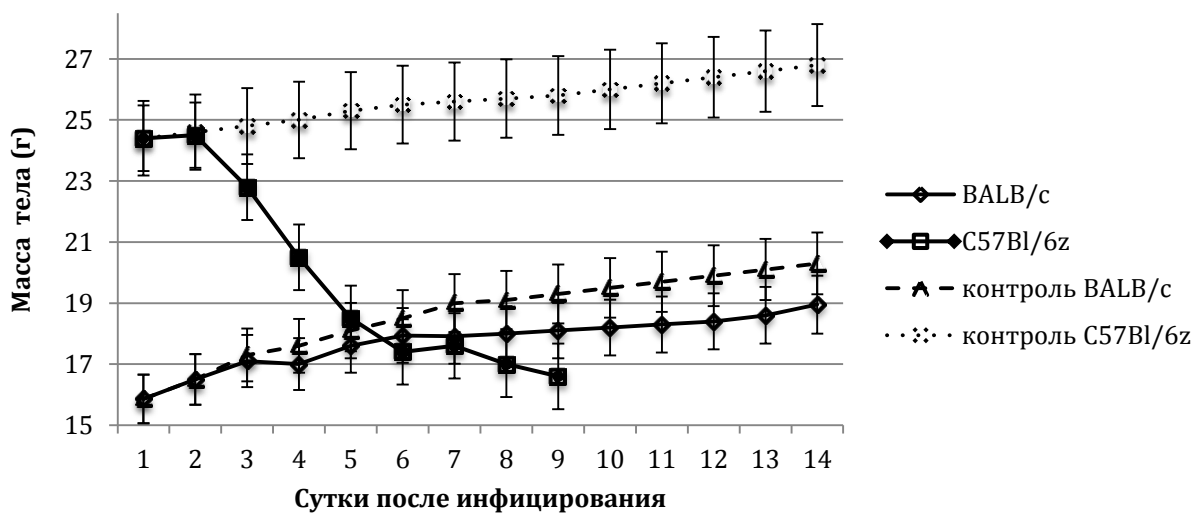


Рисунок 7. Выживаемость и изменение массы тела мышей линии BALB/c и мышей линии C57Bl/6z при перекрёстном инфицировании штаммами MA-C57Bl/6z и MA-BALB/c, соответственно.

Примечание: вес инфицированных животных $M \pm m$, где M – средняя арифметическая величина, а m – стандартная ошибка средней величины.

Проведенный сравнительный анализ показал, что штамм адаптированного пандемического ВГ A(H1N1)pdm09, полученный на мышях

линии BALB/c, является высоковирулентным не только для мышей линии BALB/c, но и для другой инбредной линии мышей C57Bl/6z. В то время как штамм MA-C57Bl/6z оказался высоко летальным только для мышей линии C57Bl/6z и низко патогенным для мышей другой инбредной линии - BALB/c.

Гистологический анализ лёгких мышей инбредных линий BALB/c и C57Bl/6z на стадии первого пассажа (Рисунок 8 В, Г) показал, что, несмотря на отсутствие клинических признаков проявления гриппозной болезни во время адаптации вирусов к экспериментальным животным, выявлено наличие дистрофических изменений в виде десквамации бронхиального эпителия, утолщения межальвеолярных перегородок, а также полнокровия венозных сосудов. Наиболее выражено проявлялись патологические изменения в лёгких мышей линии BALB/c, у которых в сосудистом русле выявлены сдвиг эритроцитов и плазматическое пропитывание кровеносных сосудов с формированием гиалиноподобных (фибриновых) мембран, что снижало кровоснабжение лёгкого и способствовало развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром). В седьмом пассаже под воздействием штамма MA-BALB/c в лёгких мышей линии BALB/c регистрировали резкое снижение воздушности респираторной части лёгкого на фоне развития интерстициальной пневмонии (Рисунок 8 Д). В лёгких мышей линии C57Bl/6z под воздействием штамма MA-C57Bl/6z, прошедшего 12 пассажей, не обнаружено резкого снижения воздушности респираторной части, однако отмечали генерализацию инфекции возле крупных и средних бронхов, а также плазматическое пропитывание кровеносных сосудов и выпотевание белков плазмы крови (Рисунок 8 Е).

Таким образом, проведённый анализ показал, что адаптированный вариант пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 вызывает развитие интерстициальной пневмонии в лёгких лабораторных мышей, к которым он адаптирован. Однако не во всех случаях экспериментального инфицирования патоген может проявлять свои вирулентные и летальные свойства на другой

экспериментальной модели животных. В ходе нашего эксперимента было показано, что только штамм *MA-BALB/c*, полученный путём пассирования через лёгкие мышей линии *BALB/c*, является высоковирулентным для всех инбредных мышей, использованных в работе.

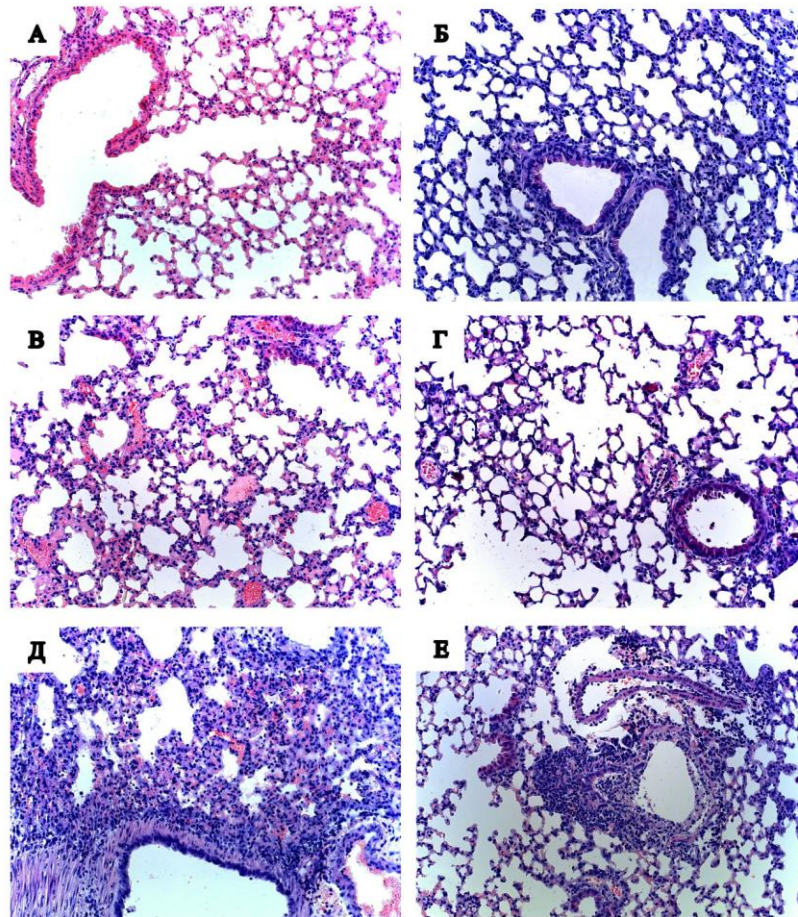


Рисунок 8. Лёгкие мышей линии *BALB/c* и *C57Bl/6z*.

Примечание: А и Б – лёгкие мышей линии *BALB/c* и *C57Bl/6z*, соответственно, получавших интраназально ФСБ (рН 7.2) в объёме 50 мкл; В и Г - лёгкие мышей линии *BALB/c* и *C57Bl/6z*, соответственно, от первого пассажа; Д и Е - лёгкие мышей линии *BALB/c* от 7-го пассажа и *C57Bl/6z* от 12-го пассажа, соответственно. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$.

Влияние адаптированного варианта пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на внутренние органы мышей линии BALB/c. С целью выявления особенностей влияния неадаптированного и адаптированного вариантов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на головной мозг, печень, почку и тонкую кишку было проведено экспериментальное инфицирование мышей линии *BALB/c* штаммом *Tomsk/2010* и штаммом *MA-BALB/c*.

В *головном мозге* под воздействием неадаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *Tomsk/2010*) на *третьи сутки* отмечается умеренное кровенаполнение коры, встречаются точечные кровоизлияния (петехиальные геморрагии), которые регистрируются преимущественно в теменных долях. Отмечали отёчность сосудов (Рисунок 9 А), находящихся преимущественно в лобной части коры головного мозга. Выявляются апоптозы, которые морфологически представлены в виде «тающих» клеток (Науменко и Митяева, 1980), апоптотических телец и клеток «теней» (Рисунок 9 А). Скопления микроглиальных клеток отмечали преимущественно в лобной доле. В пятом (ганглионарном) слое коры регистрировали единичные клетки морфологически похожие на плазматические. В коре мозжечка выраженных структурных изменений не обнаружено (Рисунок 9 Г).

В *головном мозге* под воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *MA-BALB/c*) отмечается большее кровенаполнение сосудов по всей площади коры, по сравнению с группой сравнения. В сосудах капиллярах выявляется сладж эритроцитов. Наблюдается отёчность сосудов и регистрируется достоверное увеличение диаметра сосудов коры головного мозга (Рисунок 9 В) по сравнению с аналогичными стромальными структурами в группе мышей линии *BALB/c*, инфицированных неадаптированным вариантом пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (Таблица 8).

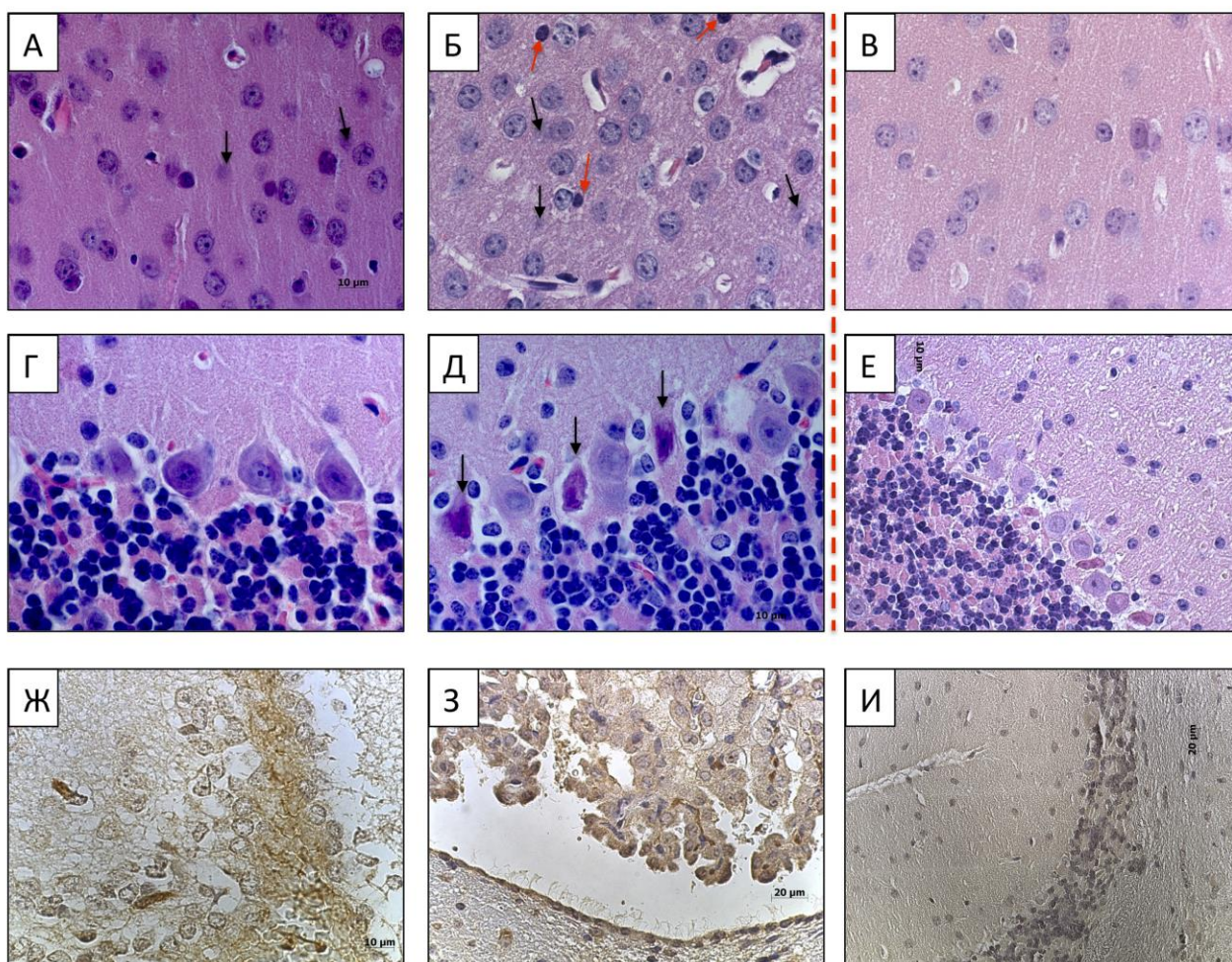


Рисунок 9. Гистологический анализ головного мозга мышей линии BALB/c, инфицированных неадаптированным и адаптированным вариантами пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (штамм *Tomsk/2010* и штамм *MA-BALB/c*).

Примечание: А и Д - головной мозг и мозжечок мышей линии BALB/c, инфицированных неадаптированным вариантом пандемического ВГ штамм *Tomsk/2010* и выведенных из эксперимента на 3 сутки после заражения. Б и И - головной мозг и мозжечок мышей линии BALB/c, инфицированных адаптированным вариантом пандемического ВГ штамм *Tomsk/2010* и выведенных из эксперимента на 3 сутки после заражения. Чёрными стрелками показаны клетки "тени", красными - некротизированные нейроны. За красной пунктирной линией В и Е - головной мозг и мозжечок мышей линии BALB/c, получавших интраназально ФСБ (рН 7.2) в объёме 50 мкл. Окраска гематоксилином и эозином. Ж и З, И - участки гематоликворного барьера мышей линии BALB/c, инфицированных неадаптированным и адаптированным вариантами пандемического ВГ штамм *Tomsk/2010*, соответственно, и выведенных из эксперимента на 3 сутки после заражения. Иммуногистохимическая окраска моноклональными антителами на NP белок ВГА.

Таблица 8. Результаты морфометрического исследования структур головного мозга, печени, почки и тонкой кишки лабораторных мышей линии BALB/c при инфицировании неадаптированным и адаптированным вариантами пандемического ВГ A(H1N1)pdm09.

| | Головной мозг | | Печень | | Почка | | | Тонкая кишка | |
|--|---|---|----------------------------------|------------------------------------|---|---|------------------------------------|--|---|
| | | | | | Почечные клубочки | | Собирательные трубки | | |
| | Среднее количество клеток «теней» на поле зрения (N_A) ¹ | Диаметры сосудов коры головного мозга (D) | Средняя величина гепатоцитов (V) | Диаметр синусоидных капилляров (D) | Диаметр почечных клубочков (D max) ² | Диаметр почечных клубочков (D min) ³ | Диаметр собирательных трубочек (D) | Среднее количество бокаловидных клеток на поле зрения (N) ¹ | Высота каёмчатых клеток эпителиального слоя (L) |
| Контроль | 4,07±0,41 | 6,74±0,10 | 17,15±1,10 | 4,01±0,45 | 56,05±1,15 | 46,71±0,82 | 18,84±0,56 | 11,66±0,08 | 14,27±0,60 |
| Неадаптированный вариант вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (штамм <i>Tomsk/2010</i>) | 8,31±0,52 ^{4***} | 6,53±0,08 | 16,45±0,15 | 4,73±0,08 | 56,07±1,08 | 46,65±1,06 | 19,46±0,34 | 9,13±1,16 ^{5***} | 16,54±0,06 ^{5***} |
| Адаптированный вариант вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (штамм <i>MA-BALB/c</i>) | 8,97±0,49 ^{4***} | 9,40±0,20 ^{4***} | 14,95±0,12 ^{4***} | 5,53±0,06 ^{4***} | 56,85±1,14 | 44,09±1,00 | 25,81±0,66 ^{4***} | 8,4±0,76* | 18,49±0,23 ^{4***} |

1 - Морфометрический обсчет клеток был выполнен в поле зрения при окуляре 10x/25 и объективе 100x/1,3 oil; 2 – D max – максимальный диаметр почечного клубочка с капсулой; 3 - D min - минимальный диаметр почечного клубочка с капсулой; 4 – достоверные различия по сравнению с контролем составили *** > 0,99; 5 – достоверные различия по сравнению с контролем составили * > 0,95.

В мозжечке под воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 были выявлены патоморфологические изменения, которые представлены большим кровенаполнением сосудов, их отёком, петехиальными геморрагиями. Зарегистрированы некрозы среди клеток Пуркинье (Рисунок 9 Д), которые количественно уменьшаются по направлению от нижних к верхним ножкам мозжечка.

Вирусологические данные показали наличие вирусного титра в головном мозге только под воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 штамма *MA-BALB/c* (Таблица 9).

Таблица 9. Количество адаптированного варианта пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 штамм *MA-BALB/c* во внутренних органах экспериментально инфицированных мышей.

| Название штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 | титр вируса в органах ¹ | | | |
|--|------------------------------------|---------|-----------|--------------|
| | головной мозг | печень | почка | тонкая кишка |
| Tomsk/2010 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MA-BALB/c | 3,75±0,22 | 2,5±0,5 | 0,74±0,48 | 0 |

Примечание: ¹ - титры вирусов выражены в lgTCID₅₀ на 1мл исследуемого образца в виде M±I95, где M - средняя арифметическая величина, а I – доверительный интервал.

Иммуногистохимическое исследование позволило выявить более выраженное накопление характерной окраски в клетках эпендимной глии, участвующих в формировании гематоликворного барьера, под воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 по сравнению с неадаптированным вариантом (Рисунок 9 Ж, З).

В печени под воздействием неадаптированного варианта вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 наблюдается неравномерное кровенаполнение синусоидных капилляров, варьирующее от слабого до интенсивного. Эритроциты в центральных венах и венах портальных трактов присутствуют в малом количестве (Рисунок 10 А, В, Д). Балочно-радиальное строение долек сохранено и чётко прослеживается. Отмечается частичное разрушение цитоплазмы гепатоцитов по типу коликовационного некроза, преимущественно

расположенных вокруг крупных вен. Портальные тракты не расширены. Капсула почки не утолщена.

Под влиянием адаптированного варианта вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в печени экспериментально инфицированных мышей наблюдается интенсивное кровенаполнение синусоидных капилляров. Центральные вены и вены портальных трактов неравномерно кровенаполнены: от умеренного до полнокровного состояний (Рисунок 10 Б, Г). Во всех кровеносных сосудах, в том числе в капиллярах, отмечается агрегация эритроцитов и выпотевание белков плазмы крови. Регистрируются локальные кровоизлияния, которые не были зарегистрированы в группе сравнения. Балочно-радиальное строение сохранено. Капсула печени не утолщена. Под влиянием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 в печени мышей линии BALB/с регистрируется достоверное уменьшение объёмной плотности гепатоцитов при увеличении диаметра синусоидных капилляров (Таблица 8).

Вирусологические данные показали наличие вирусного титра в печени только под воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 (Таблица 9). Иммуногистохимическое исследование выявило характерное накопление окраски в эндотелиоцитах центральных вен печени только под воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 (Рисунок 10 Е).

В *почке* под воздействием неадаптированного варианта пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 отмечается умеренное кровенаполнение сосудов (Рисунок 11 В). В капиллярах коркового и мозгового вещества регистрируется сдвиг эритроцитов и выпотевание белков плазмы крови. Почечные тельца имеют правильную форму с выраженным просветом между париетальным и висцеральным листками капсулы.

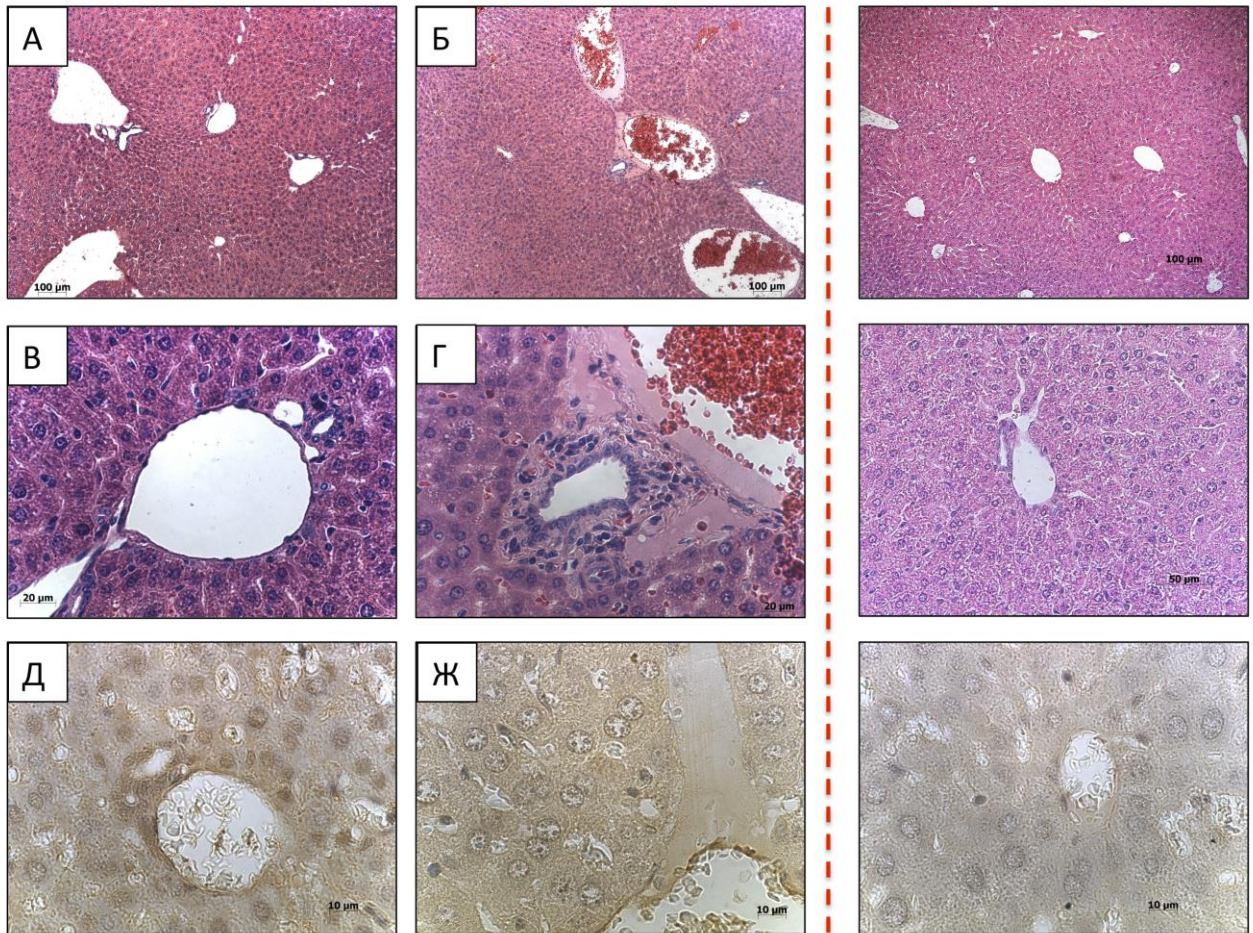


Рисунок 10. Гистологический анализ печени мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом *Tomsk/2010* и штаммом *MA-BALB/c*.

Примечание: А, В и Д - печень мышей линии BALB/c, инфицированных неадаптированным вариантом пандемического вируса гриппа штаммом *Tomsk/2010* и выведенных из эксперимента на 3 сутки после заражения. Б, Г и Ж - печень мышей линии BALB/c, инфицированных адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа штаммом *MA-BALB/c* и выведенных из эксперимента на 3 сутки после заражения. За красной пунктирной линией - печень мышей линии BALB/c, получавших интраназально ФСБ (рН 7.2) в объёме 50 мкл. Использованы окраски гематоксилином и эозином, а также иммуногистохимическая окраска моноклональными антителами на NP белок ВГА.

При исследовании почек мышей, инфицированных адаптированным вариантом пандемического ВГ A(H1N1)pdm09, отмечали значительно большее кровенаполнение сосудов коркового вещества (Рисунок 11 Б, Г) по сравнению с воздействием неадаптированного варианта пандемического ВГ A(H1N1)pdm09. В капиллярах наблюдается сладж эритроцитов и выпотевание белков плазмы крови, что указывает на нарушение реологических свойств крови (Рисунок 11 Г). В мозговом веществе почки отмечается достоверное

увеличение диаметра собирательных трубочек, по сравнению с аналогичными структурами в почках мышей, инфицированных неадаптированным вариантом пандемического ВГ, при этом регистрируется увеличение просвета трубочек и уменьшение высоты эпителиальных клеток (данные не представлены).

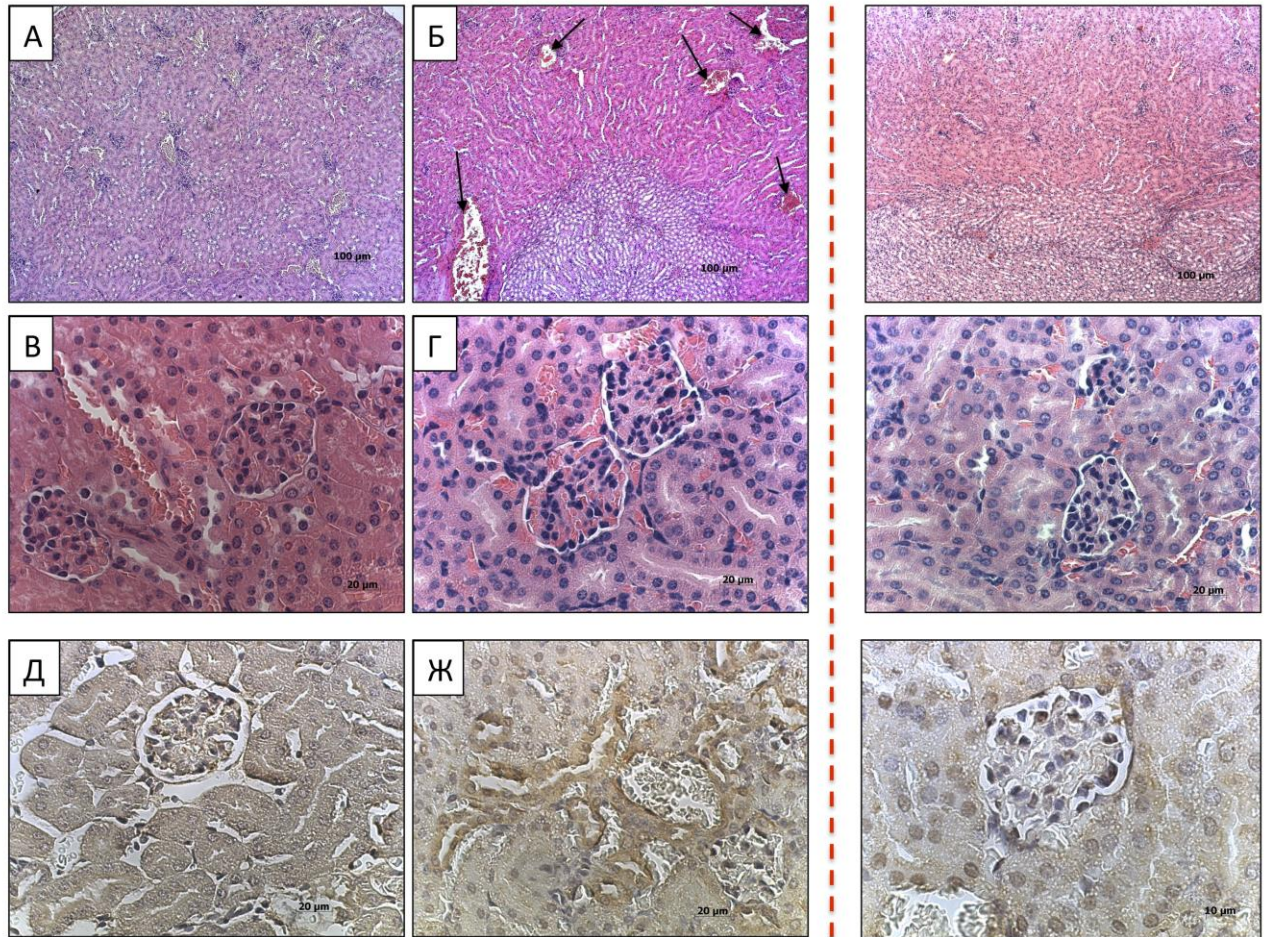


Рисунок 11. Гистологический анализ почки мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом *Tomsk/2010* и штаммом *MA-BALB/c*.

Примечание: А, В и Д - почки мышей линии BALB/c, инфицированных неадаптированным вариантом пандемического вируса гриппа *Tomsk/2010* и выведенных из эксперимента на 3 сутки после заражения. Б, Г и Ж - почки мышей линии BALB/c, инфицированных адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа *MA-BALB/c* и выведенных из эксперимента на 3 сутки после заражения. За красной пунктирной линией - почки мышей линии BALB/c, получавших интраназально ФСБ (рН 7.2) в объёме 50 мкл. Использованы окраски гематоксилином и эозином, а также иммуногистохимическая окраска моноклональными антителами на NP белок ВГА.

Вирусологические данные показали наличие вирусного титра в почке только под воздействием адаптированного варианта ВГ A(H1N1)pdm09

(Таблица 9). Иммуногистохимическое исследование обнаружило характерное накопление окраски в собирательных трубочках коркового вещества почки только под воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 (Рисунок 11 Е). Вероятно, данный факт объясняет достоверное увеличение диаметра собирательных трубочек коркового вещества почки.

В *тонкой кишке* под воздействием неадаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 отмечается умеренное кровенаполнение сосудов слизистой оболочки. Регистрируется частичная десквамация каёмчатого эпителия и гиперсекреция бокаловидных клеток ворсин (Рисунок 12 Д).

Под воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 в эпителии слизистой оболочки тонкой кишки отмечается уменьшение длины ворсин и высоты крипт (Рисунок 12 А, Б) по сравнению с аналогичными структурами в группе мышей, инфицированных неадаптированным вариантом ВГ А(Н1N1)pdm09. В просвете кишки наблюдаются обширные локусы десквамированной эпителиальной выстилки ворсин, в которых регистрируются дегенеративные изменения собственной пластинки. Данные дистрофически-некротические изменения затрагивают значительную площадь собственной пластинки ворсин, чего не наблюдалось в слизистой оболочке у мышей группы сравнения (Рисунок 12 В и Г). Морфометрический анализ показал достоверное увеличение высоты каёмчатых клеток эпителиального слоя ворсин под воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 по сравнению с контролем (Таблица 8). Кроме того, в этой же группе в слизистой оболочке отмечается гиперсекреция бокаловидных клеток (Таблица 8) и увеличение количества клеток с ацидофильными гранулами (клеток Панета) (данные не представлены). Капилляры и сосуды слизистой оболочки значительно полнокровны, по сравнению со стромальными структурами группы сравнения. В слизистой оболочке стенки тонкого кишечника встречаются кровоизлияния и эритроцитарный сладж. Местами отмечается разрыхление мышечной оболочки.

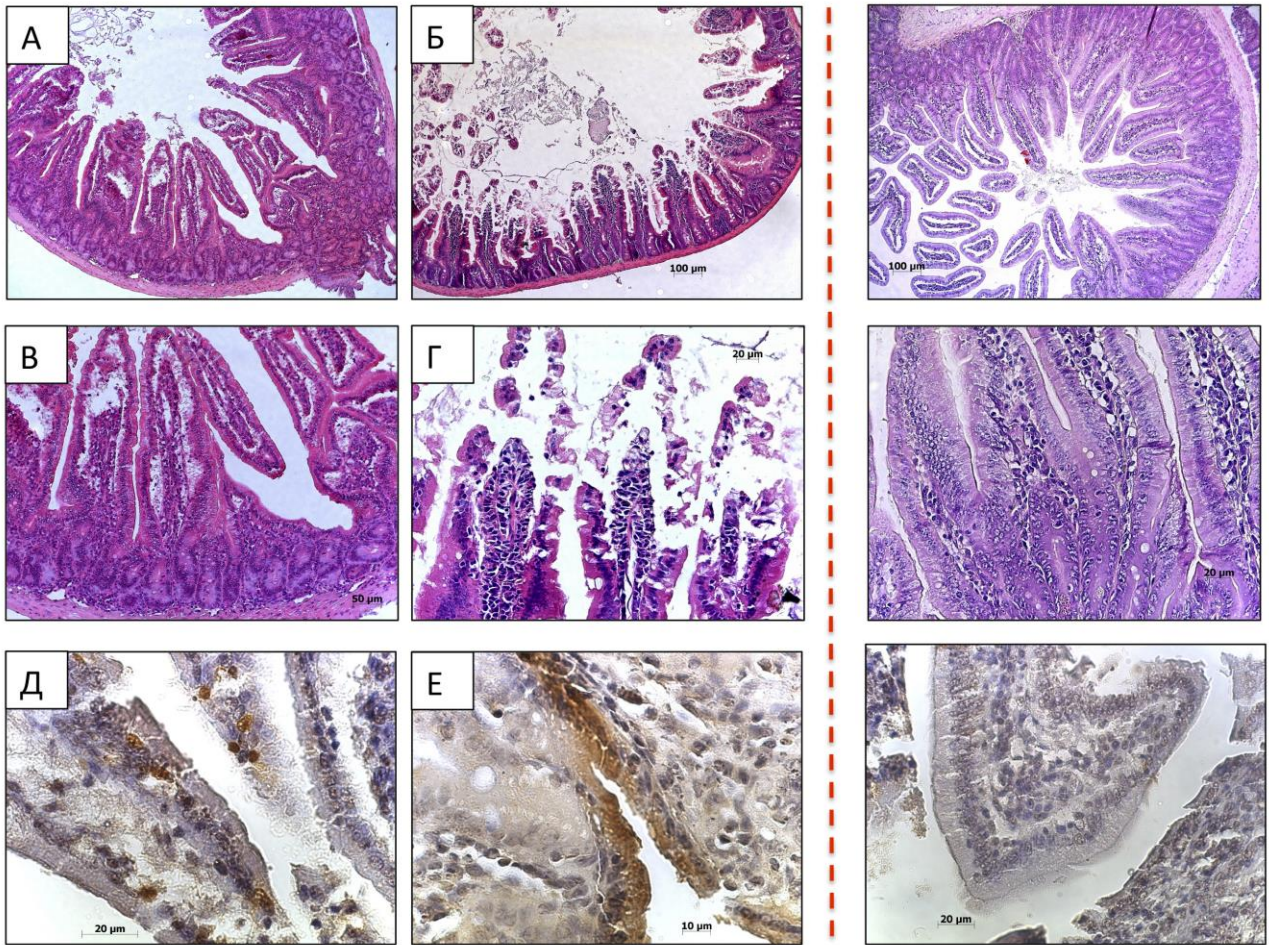


Рисунок 12. Гистологический анализ тонкой кишки мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом *Tomsk/2010* и штаммом *MA-BALB/c*.

Примечание: А, В и Д - тонкая кишка мышей линии BALB/c, инфицированных неадаптированным вариантом пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 штаммом *Tomsk/2010* и выведенных из эксперимента на 3 сутки после заражения. Б, Г и Ж - тонкая кишка мышей линии BALB/c, инфицированных адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 штаммом *MA-BALB/c* выведенных из эксперимента на 3 сутки после заражения. За красной пунктирной линией - тонкая кишка мышей линии BALB/c, получавших интраназально ФСБ (рН 7.2) в объёме 50 мкл. Использованы окраски гематоксилином и эозином, а также иммуногистохимическая окраска моноклональными антителами на NP белок ВГА.

С помощью вирусологических методов анализа в тонкой кишки не было обнаружено титра ВГ A(H1N1)pdm09 ни в одной из экспериментальных групп (Таблица 9). Однако иммуногистохимическое исследование выявило характерное накопление окраски в апикальной части ворсин тонкого кишечника, преимущественно выраженного под воздействием адаптированного варианта ВГ A(H1N1)pdm09 (Рисунок 12 Д и Е). Однако отсутствие

вирусологически подтвержденных данных, возможно, говорит о малой вирусной нагрузке адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 на тонкую кишку. Полученные данные требуют дальнейшего изучения вопроса.

Ультроструктурное исследование лёгких у мышей линии BALB/c, инфицированных неадаптированным и адаптированным вариантами пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09. На первые сутки после инфицирования в лёгких мышей обеих групп отмечали кровенаполнение капилляров. В цитоплазме альвеолоцитов регистрировали локальные участки расплавления, приводящие к развитию баллонной дистрофии. Отмечали появление вакуолей в митохондриях (Рисунок 13 А). Кристаллоиды, представляющие собой агрегаты сформировавшихся вирусных частиц, регистрировали в альвеолоцитах 1-го и 2-го порядков. В ядрах альвеолоцитов II типа регистрировали небольшие выпячивания, за счёт которых увеличивалась ядерная поверхность, обусловленная гиперфункцией клеток. В полости альвеолярных мешков встречали единичные вирионы и комплексы, состоящие из полных и неполных нуклеокапсидов, окруженных мембраной. Сохранность эпителиальных клеток у мышей, инфицированных неадаптированным вариантом пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *Tomsk/2010*), выше по сравнению с состоянием клеток мышей, инфицированных адаптированным вариантом пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *MA-BALB/c*).

На третьи сутки после инфицирования эндотелиальная стенка у мышей обеих групп нарушена (Рисунок 13 Б). Ядра эндотелиоцитов пикнотизированы, в цитоплазме появлялось много вакуолей, миелиноподобных структур, крупные вакуолярные структуры с электронносветлым хлопьевидным содержимым. В ядре и цитоплазме альвеолоцитов и в альвеолярных макрофагах отмечались центры размножения вируса. Подэндотелиальное пространство расширено, обводнено, в нём обнаруживаются вирионы. Отмечено появление гиалиновых мембран - плотных масс, образованных белками плазмы крови -

располагающихся по стенкам альвеол. Регистрировали утолщение эластических мембран и появление коллагеновых волокон.

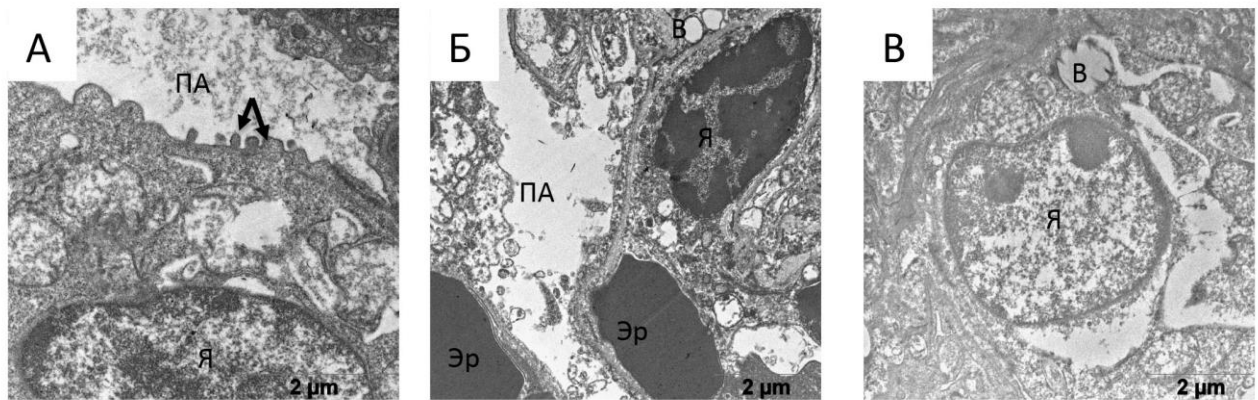


Рисунок 13. Изменения ультраструктур клеток лёгкого мышей линии BALB/c, инфицированных адаптированным вариантом вируса гриппа A(H1N1)pdm09 штаммом MA-BALB/c.

Примечание: А – на 1-е сутки видны отпочковывающиеся вирусные частицы с поверхности альвеолоцита I порядка (ПА – полость альвеолы; Я – ядро; В - вакуоль); Б – на 3-и сутки отмечается вакуолизация клетки альвеолярного эпителия; В - на 6-е сутки отмечается гетерорасположенный хроматин в ядре альвеолярного макрофага, а также участки с вироплазмой. Бар соответствует 1 мкм.

Таким образом, в клетках лёгких к третьим суткам продолжалось развитие альтерации и увеличение вирусной массы за счет его репродукции в паренхиматозных клетках. В целом в клетках мышей обеих групп отмечали усугубление патологического процесса, ярче выраженного под воздействием штамма MA-BALB/c.

На шестые сутки в клетках лёгких мышей, инфицированных штаммом A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09) и штаммом MA-BALB/c, на поверхности альвеолоцитов продолжали регистрировать картины ассоциации и отшнуровки вирионов (Рисунок 13 В). Ядра клеток неправильной формы, гетерохроматин образует глыбки. Под воздействием штамма MA-BALB/c центры репродукции вируса преимущественно обнаруживали в альвеолоцитах 2-го типа. Кроме того, в цитоплазме регистрировали множество везикулярных структур, большое количество свободных и прикрепленных к немногочисленным профилям эндоплазматической сети полисом с признаками образования

нуклеопротеидных тяжей, разрушенные митохондрии. Альвеолярные макрофаги находились в состоянии активного фагоцитоза. Границы их клеток были значительно изрезаны, ядра неправильной формы, содержащие небольшое количество пристеночно расположенного гетерохроматина. Также в них регистрировали редкие полные нуклеокапсиды и много вироплазмы - модифицированные области цитоплазмы инфицированных клеток, в которых происходит синтез и сборка компонентов вирусов (Рисунок 13 В).

Сравнительный анализ патологических процессов, протекающих в клетках лёгких мышей линии BALB/c на шестые сутки под воздействием неадаптированных и адаптированных вариантов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, показал наличие активной вирусной продукции в альвеолоцитах 1-го и 2-го типов. При этом под воздействием штамма MA-BALB/c центры репродукции вируса преимущественно обнаруживали в альвеолоцитах 2-го типа, а также регистрировали большое количество вироплазмы в альвеолярных макрофагах (Рисунок 13 В).

Ультроструктурное исследование головного мозга у мышей линии BALB/c, инфицированных неадаптированным и адаптированным вариантами пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09. На первые сутки в головном мозге мышей после заражения неадаптированным вариантом пандемического ВГ A(H1N1)pdm09 (штамм Tomsk/2010и адаптированным вариантом пандемического ВГ A(H1N1)pdm09 (штамм MA-BALB/c) отмечали отёк в периваскулярной области в обеих группах экспериментальных животных. В цитоплазме микроглии регистрировали фагосомы (Рисунок 14).

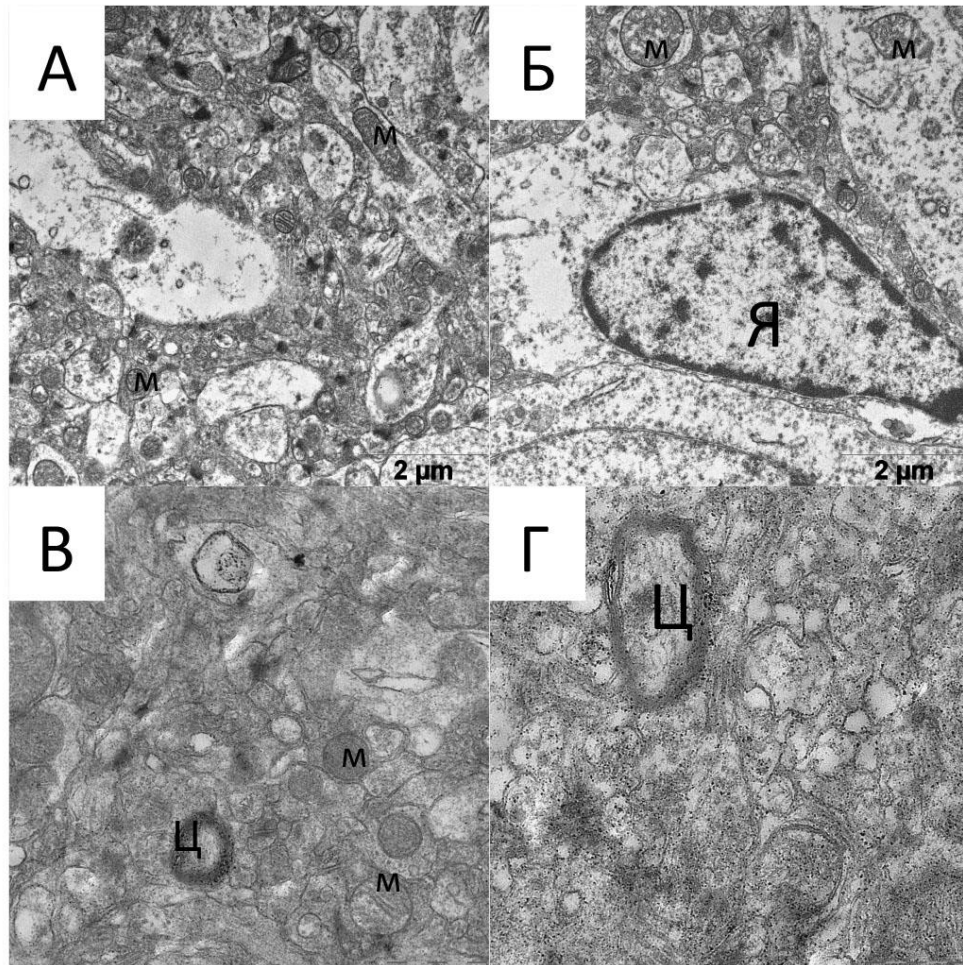


Рисунок 14. Изменения ультраструктур клеток головного мозга мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом *Tomsk/2010* и штаммом *MA-BALB/c*.

Примечание: А и Б – 6-е сутки после инфицирования неадаптированным вариантом пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (Я – ядро; Ц - цитосигресома); В и Г – на 1-е и 3-и сутки после инфицирования адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, соответственно. Бар соответствует 1 мкм.

На третьи сутки в ткани головного мозга мышей, инфицированных штаммом *Tomsk/2010*, отмечали отёк в периваскулярной области. В периваскулярном пространстве определяли вирионы, продукция которых преимущественно регистрировалась в эпендимной глии, участвующей в составе гематоликворного барьера. Кроме того, в ядрах макрофагов отмечали характерную пятнистость (Рисунок14).

На шестые сутки инфекции в головном мозге мышей, инфицированных штаммом *Tomsk/2010*, сохранялся отёк в периваскулярной области и регистрировались клеточные некрозы.

Повреждения головного мозга у мышей под воздействием штамма *MA-BALB/c* имели более выраженный характер – повсеместные отёки, много очагов некроза (Рисунок14). Регистрировали наличие клеточного детрита, клеток с обводнёнными митохондриями и клеток с полисомами. В клетках макроглии содержалось много миелиноподобных структур (цитосегресом), расположенных хаотично в цитоплазме (Рисунок14). Продукция вируса продолжалась в глии. Вироплазму обнаруживали также в разрушенных клетках периваскулярной зоны (Рисунок14).

3.2 Изучение биологических свойств штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших во время пандемии 2009 г. и в постпандемический период в 2011 г. на территории Сибири

Сравнительный анализ вирусологических, молекулярно-биологических и иммуногенных свойств штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших во время пандемии 2009 г. и в постпандемический период в 2011 г. на территории Сибири. С целью изучения биологических свойств штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших во время пандемии 2009 г. и в постпандемический период в 2011 г. на территории Сибири были выбраны на основании сходных характеристик по антигенным и молекулярно-биологическим свойствам внутри своих групп - штамм *N13-2009* и штамм *KSH-2011* (Iyicheva et al., 2011). Согласно филогенетическому анализу по двум генам HA и NA, выбранные штаммы принадлежат разным генетическим группам. Штамм 2009 г. филогенетически наиболее близок к генам вирусов, выделенных на территории Украины и Гонконга, но эти вирусы не выделяют в отдельную генетическую группу из-за высокой гомологии (99% и выше) с референс-штаммом *A/California/07/2009*. Штамм *KSH-2011*

принадлежит к седьмой генетической группе, к которой также относятся вирусы, циркулировавшие в мире в 2010-2011 гг., согласно учету последовательностей, предложенному в докладе Сотрудничающего центра ВОЗ по изучению вирусов гриппа в Лондоне (Report Prepared for the WHO Annual Consultation on the Composition of Influenza Vaccine for the Northern Hemisphere, 2012) (Рисунок 15, 16). Аминокислотные замены в белках гемагглютинина и нейраминидазы штаммов *N13-2009* и *KSH-2011* в сравнении с белками одного из первых выделенных штаммов пандемического вируса *A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)pdm09* и вакцинного штамма *A/California/07/2009(H1N1)pdm09* приведены в таблице 10. У штамма, циркулировавшего в постпандемический период, отмечали большее количество аминокислотных замен, характерных для вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 2011 г.

При заражении мышей выбранными штаммами признаки болезни в обеих группах животных регистрировали с 1-х суток. Болезнь сопровождалась конъюнктивитом, одышкой (с усилением брюшного дыхания), снижением активности, уменьшением массы тела, негативными изменениями качества шерсти. В течение всего срока наблюдения гибели животных в обеих группах не зафиксировано. При этом титры вирусов в лёгких регистрировали до 6-х суток ($3,6 \pm 0,38 \text{ lgTCID}_{50}/\text{мл}$ у штамма *N13-2009* и $2,3 \pm 1,10 \text{ lgTCID}_{50}/\text{мл}$ у штамма *KSH-2011*). Отмечено, что в 1-е сутки показатели титра вируса в лёгких были достоверно выше у штамма 2009 г. ($4,0 \pm 0,38 \text{ lgTCID}_{50}/\text{мл}$) по сравнению со штаммом 2011 г. ($2,6 \pm 0,40 \text{ lgTCID}_{50}/\text{мл}$).

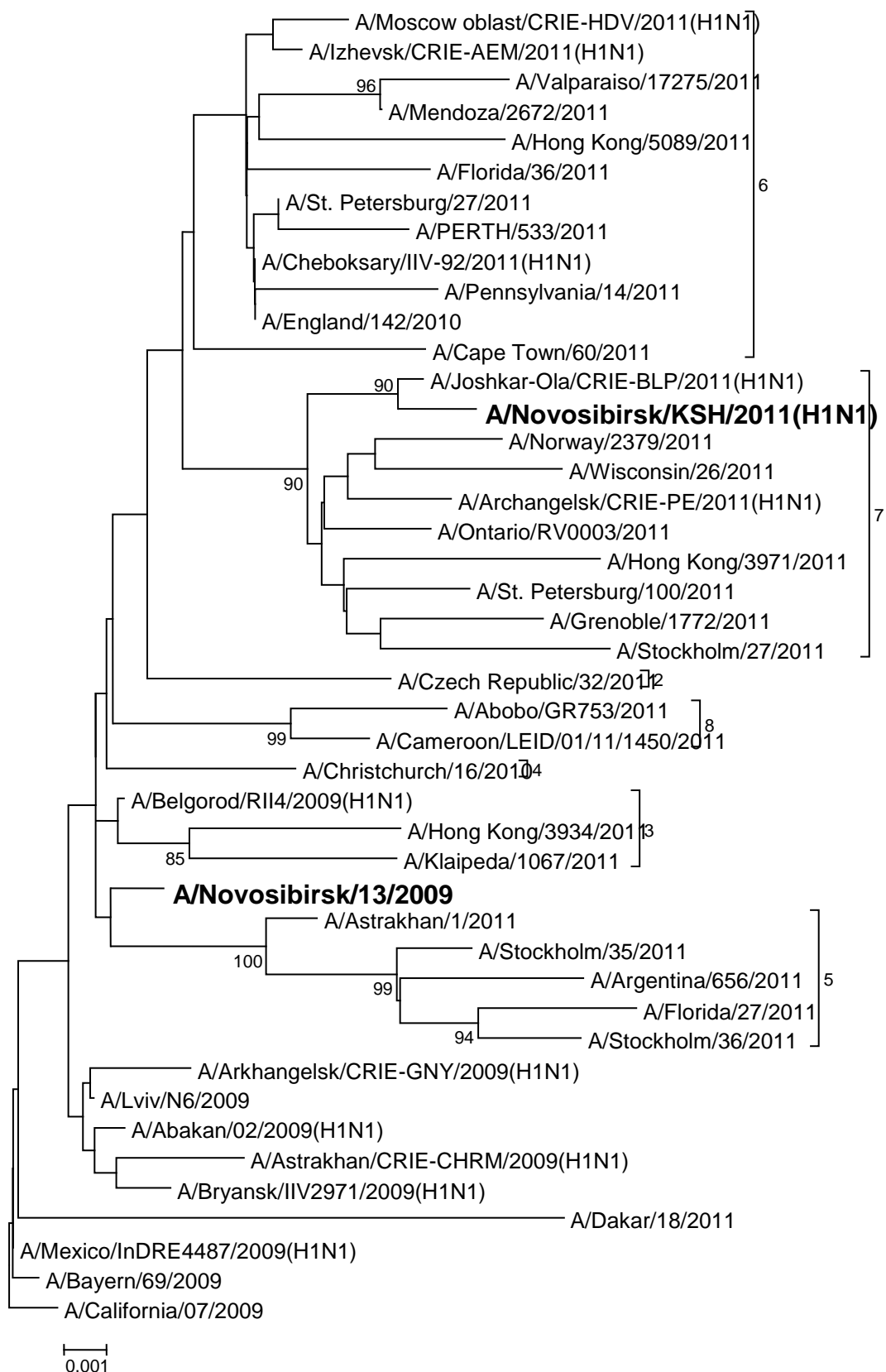


Рисунок 15. Филогенетическое дерево HA.

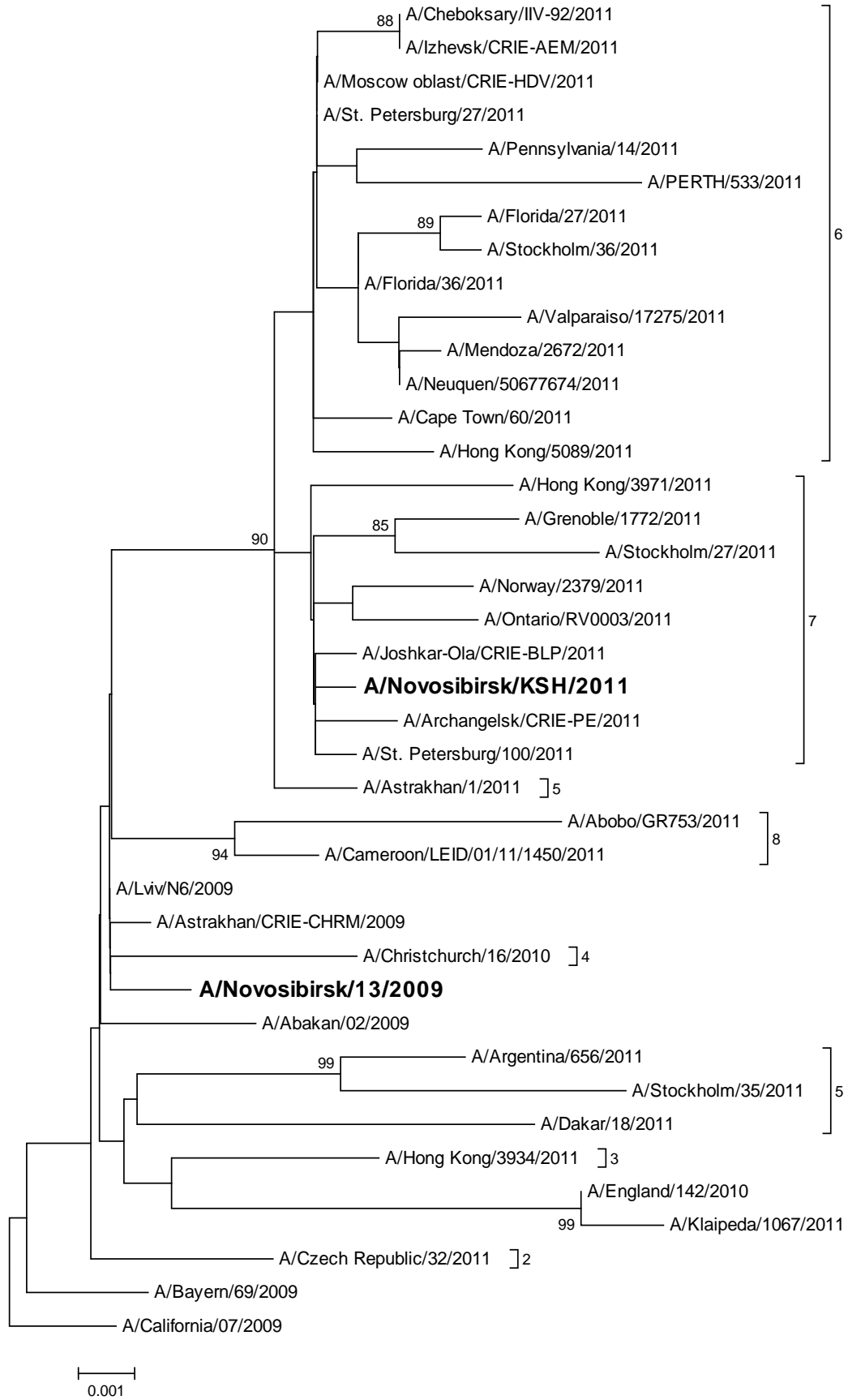


Рисунок 16. Филогенетическое дерево NA.

Таблица 10. Аминокислотные замены в HA и NA шаммов *A/Novosibirsk/13/2009(H1N1)pdm09* (N13-2009) и *A/Novosibirsk/KSH/2011(H1N1)pdm09* (KSH-2011).

| Штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09 | HA1 | | | | | | | | | | | HA2 | | NA | |
|--|-------------------------|----------|----------|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----|-----|----------|----------|
| | <u>Антигенные сайты</u> | | | | | | | | | | | | | | |
| | Ca | | | Cb | Sb | | | | | | | | | | |
| | 166 | 203 | 205 | 70 | 185 | 83 | 143 | 197 | 211 | 215 | 321 | 374 | 451 | 106 | 248 |
| <i>A/Mexico/InDRE4487/2009(H1N1)</i> | I | S | R | L | S | S | S | A | K | A | V | E | S | V | N |
| <i>A/California/07/2009(H1N1)</i> | | | | | | P | | T | | | I | | | | |
| <i>A/Novosibirsk/13/2009(H1N1)</i> | <i>T</i> | <u>T</u> | <i>K</i> | | | | | <u>A</u> | | | <u>V</u> | | | <u>I</u> | <u>D</u> |
| <i>A/Abakan/02/2009(H1N1)</i> | | <u>T</u> | | | | | | | | | | | | <u>I</u> | <u>D</u> |
| <i>A/Arkhangelsk/CRIEGNY/2009(H1N1)</i> | | <u>T</u> | | | | | | | | | I | | | <u>I</u> | <u>D</u> |
| <i>A/Astrakhan/CRIECHRM/2009(H1N1)</i> | | <u>T</u> | | | | | | | | | I | | | <u>I</u> | <u>D</u> |
| <i>A/Bryansk/IIV2971/2009(H1N1)</i> | | <u>T</u> | | | | | | | | | I | | | <u>I</u> | <u>D</u> |
| <i>A/Novosibirsk/KSH/2011(H1N1)</i> | | <u>T</u> | | | <i>F</i> | <u>T</u> | <u>G</u> | <u>T</u> | <i>N</i> | <i>E</i> | V | K | N | <u>I</u> | <u>D</u> |
| <i>A/Cheboksary/IIV-92/2011(H1N1)</i> | | <u>T</u> | | | | <u>T</u> | | | | | | K | N | <u>I</u> | <u>D</u> |
| <i>A/Archangelsk/CRIE-PE/2011(H1N1)</i> | | <u>T</u> | | | | <u>T</u> | <u>G</u> | <u>T</u> | | | | K | N | <u>I</u> | <u>D</u> |
| <i>A/Izhevsk/CRIE-AEM/2011(H1N1)</i> | | <u>T</u> | | | | <u>T</u> | | | | | | K | N | <u>I</u> | <u>D</u> |
| <i>A/Joshkar-Ola/CRIE-BLP/2011(H1N1)</i> | | <u>T</u> | | | | <u>T</u> | <u>G</u> | <u>T</u> | | | | K | N | <u>I</u> | <u>D</u> |
| <i>A/Moscowoblast/CRIEHDV/2011(H1N1)</i> | | <u>T</u> | | | <i>F</i> | <u>T</u> | | | | | | K | N | <u>I</u> | <u>D</u> |

Примечания: аминокислоты, выделенные **жирным шрифтом** и подчеркиванием, по литературным данным, являются характерными заменами для описываемых штаммов в период их циркулирования. *Курсивом* выделены уникальные аминокислотные замены.

Для оценки иммуногенных свойств анализируемых штаммов были исследованы сыворотки крови мышей в РТГА и в реакции МН с вирусами, которыми были инфицированы мыши. Инфицирование мышей штаммом *N13-2009* привело к развитию выраженного гуморального ответа: в 4 из 5 сывороток титры антител в РТГА и реакции МН с обоими штаммами вируса А(Н1N1)*pdm09* были выше пороговых значений (Таблица 11). В то же время в сыворотках мышей, инфицированных штаммом *KSH-2011*, определяли антитела только к гомологичному штамму в 1 из 6 сывороток в РТГА и в 4 из 6 сывороток в реакции МН. Таким образом, эксперименты на мышах показали, что штамм 2011 г. обладал сниженной иммуногенностью по сравнению со штаммом 2009 г.

Для подтверждения этого факта тестировали иммуногенные свойства штаммов вируса гриппа А(Н1N1)*pdm09*, выделенных в 2010-2011 гг. от пациентов из Новосибирской области с подтвержденным диагнозом "грипп". От этих же пациентов после окончания заболевания были взяты и сыворотки крови для анализа титра противовирусных антител. Результаты РТГА и реакции МН сывороток крови 9 переболевших человек с референс-штаммом А/California/07/09(Н1N1)*pdm09*, а также со штаммами вируса гриппа А(Н1N1)*pdm09*, выделенными от этих пациентов, приведены в таблице 11. Только в 3 образцах сыворотки (24, 107, KSH) обнаружены диагностические титры антител в РТГА и реакции МН с вакцинным штаммом вируса гриппа А(Н1N1)*pdm09* и в 5 образцах (24, 102, 104, 107, KSH) - в РТГА с гомологичными штаммами (Таблица 12). Результаты показали, что только в 1 образце сыворотки достигли значения 1/320 в РТГА с гомологичным антигеном.

Таблица 11. РТГА и реакция МН с сыворотками мышей, инфицированных
 A/Novosibirsk/13/2009(H1N1)pdm09 и A/Novosibirsk/KSH/2011(H1N1)pdm09.

штаммом

| Вирус | Сыворотка | Титр в РТГА с антигеном | | Титр в МН с вирусом | |
|---|-----------|-------------------------|----------|---------------------|----------|
| | | N13-2009 | KSH-2011 | N13-2009 | KSH-2011 |
| N13-2009 (A/Novosibirsk/13/2009 (H1N1)pdm09) | KSh-1 | <20 | 20 | 40 | <20 |
| | KSh-2 | <20 | 20 | 80 | <20 |
| | KSh-3 | <20 | 20 | 80 | <20 |
| | KSh-4 | <20 | 20 | 160 | <20 |
| | KSh-5 | 20 | 40 | <20 | 160 |
| | KSh-6 | <20 | 20 | <20 | 40 |
| KSH-2011 (A/Novosibirsk/KSH/2011 (H1N1)pdm09) | Ru-1 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| | Ru-2 | 320 | 320 | 1280 | 640 |
| | Ru-3 | 160 | 80 | 640 | 320 |
| | Ru-4 | 160 | 40 | 160 | 320 |
| | Ru-5 | 160 | 80 | 160 | 320 |

Таблица 12. РТГА с сыворотками людей, переболевших в 2011 г. гриппом А(Н1N1)pdm09.

| Сыворотки крови пациентов | Титр сыворотки в РТГА с антигеном А/California/07/2009 (H1N1)pdm09 | Титр сыворотки в реакции МН с вирусом гриппа А/California/07/2009 (H1N1)pdm09 | Титр сыворотки в РТГА с гомологичным антигеном |
|---------------------------|--|---|--|
| 24 | 40 | 40 | 40 |
| 27 | 20 | 20 | 5 |
| 53 | 5 | 10 | 20 |
| 57 | 10 | 10 | 20 |
| 102 | 5 | 10 | 80 |
| 104 | 5 | 10 | 40 |
| 107 | 160 | 40 | 320 |
| 110 | 10 | 10 | 20 |
| KSH | 40 | 40 | 40 |

Сравнительный анализ структурных изменений в лёгком у экспериментальных животных при инфицировании штаммами вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, циркулировавших во время пандемии 2009 г. и в постпандемический период в 2011 г. на территории Сибири. На первые сутки после заражения штаммами N13-2009 и KSH-2011 в обеих группах регистрировали хорошо выраженное дольчатое строение лёгких. В бронхах отмечали дисконпозицию и десквамацию эпителиальных клеток и отёк подслизистой основы. В просветах бронхов регистрировали единичные мононуклеары. Кровенаполненность мелких кровеносных сосудов.

Таким образом, через 24 часа после заражения существенных изменений отмечено не было. Однако в лёгких мышей, инфицированных изолятом 2009 года (N13-2009), регистрировали небольшие скопления эритроцитов в альвеолах, спазм мелких сосудов и незначительное уплотнение респираторной ткани вокруг них (Рисунок 17 А, Б).

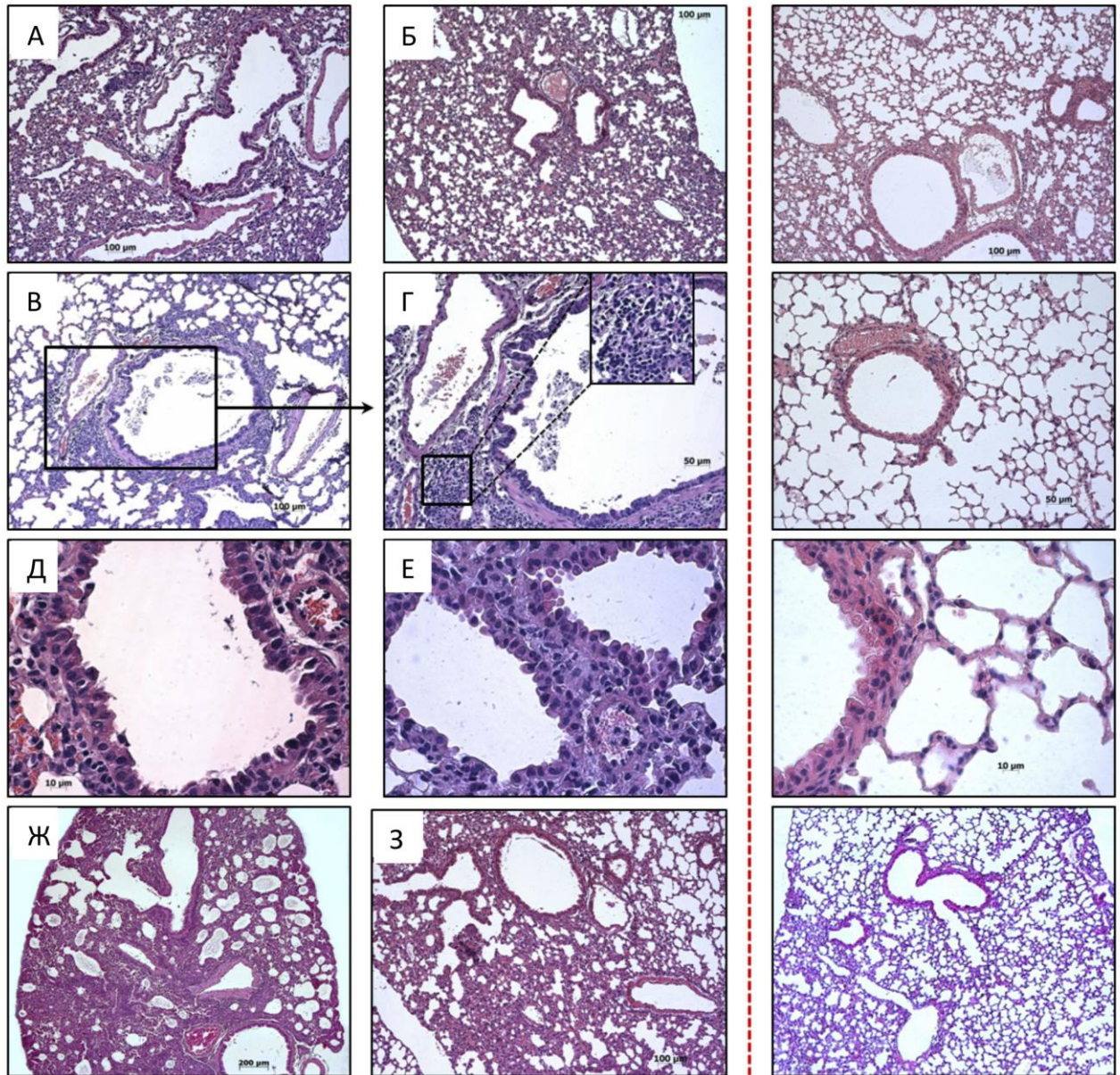


Рисунок 17. Патоморфологические изменения в лёгких мышей под воздействием штамма N13-2009 и штамма KSH-2011.

Примечание: лёгкие мышей, зараженных штаммом *N13-2009*: (А) 1 сутки после инфицирования (с.п.и); (В-Д) 6 с.п.и. - эпителиальная десквамация, лимфоцитарная инфильтрация; (Ж) 10 с.п.и. - интерстициальная пневмония. Лёгкие мышей, зараженных штаммом *KSH-2011*: (Б) 1 с.п.и.; (Е) 6 с.п.и.; (З) 10 с.п.и. Контроль показан за красной пунктирной линией.

На третьи сутки инфекции бронхи мышей в обеих группах имеют округлую или деформированную форму. В крупных и средних бронхах со стороны просвета регистрировали клеточный детрит и небольшое количество эритроцитов. В бронхиальной выстилке отмечали дисконпозицию эпителиоцитов. Бокаловидные клетки переполнены секретом. Эпителиальный слой частично отслаивался от базальной мембраны. Усиливался отёк бронхиальной стенки, вовлекая в патологический процесс мышечный и адвентициальный слои. Выражены признаки бронхоспазма, просветы междольковых бронхов уменьшены, ткань вокруг мелких бронхов и бронхиол уплотнена за счет инфильтратов. Просветы большинства альвеол свободны, в отдельных альвеолах скапливался жидкий экссудат с белками плазмы. Кроме того, в них обнаруживалось небольшое количество эритроцитов и единичные лимфоциты.

Таким образом, на третьи сутки после инфицирования в обеих группах воспалительный процесс начинался с бронхиального эпителия. Развивалось дистрофическое изменение эпителия лёгкого. Однако в случае инфицирования изолятом 2009 года патологический процесс виден не только в крупных и средних бронхах, но так же и в мелких бронхах. Что, в свою очередь, говорит о распространении инфекционного заболевания, вызванного вирусами гриппа, в нижние отделы респираторного тракта экспериментальных мышей.

На шестые сутки после инфицирования в обеих группах нарушена воздушность респираторной части лёгкого. Отмечали гиперсекрецию муцин-продуцирующих клеток бронхиол. В просвете средних и мелких бронхов отмечали клеточный детрит, многоядерные клетки и слизь (Рисунок 17 В, Д, Е). Регистрировали очаги лейкоцитарной инфильтрации, расположенные в межальвеолярных перегородках, перибронхиально и периваскулярно. Эпителиоциты в состоянии сливных некрозов. Большое количество макрофагов находилось в активированном состоянии. В просветах воздухоносных путей и в интерстиции также регистрировали большое количество макрофагов. В

интерстициальной ткани, окружающей воздухоносные пути и альвеолы, были обнаружены отёки и сливные некрозы. Плазматическое пропитывание отмечали не только в стенках кровеносных сосудов, но также и в интерстиции.

Сосуды системы лёгочной артерии имеют деформированный просвет. Периваскулярная строма и альвеолярные перегородки отёчны. Мелкие сосуды мышечного типа спазмированы. Отмечали сладж эритроцитов, который, в свою очередь, был причиной окклюзии мелких сосудов. Вследствие гемолиза эритроцитов происходило накопление фибриновых масс.

Таким образом, на шестые сутки после инфицирования в обеих группах сохранялся воспалительный процесс в эпителиальной ткани бронхов, который постепенно переходил в интерстициальную ткань с последующим развитием интерстициальной пневмонии. Патологический процесс наиболее выражен в случае инфицирования штаммом *N13-2009*.

На десятые сутки после заражения в лёгких экспериментально зараженных мышей штаммом *N13-2009* была ярко выражена картина воспалительных изменений (Рисунок 17 Ж). На обширных участках происходило резкое снижение воздушности альвеолярной ткани. Кроме того, в респираторной ткани регистрировали интраальвеолярные кровоизлияния, что не наблюдалось во второй группе инфицированных животных. Локализация данных кровоизлияний неравномерная. В просвете альвеол, кроме эритроцитов, регистрировались альвеолярные макрофаги, лимфоциты и десквамированные альвеолоциты. В участках крупных кровоизлияний происходил разрыв стенок альвеол и альтеративные изменения сосудов. В стенках кровеносных сосудов отмечали пропитывание белками плазмы крови.

В группе мышей, инфицированных штаммом *KSH-2011*, в альвеолах наряду с процессами деструкции наблюдали картины, свидетельствующие о начале репаративных процессов, что подтверждалось наличием фибробластов и коллагеновых волокон (Рисунок 17 З). Регистрировалось уменьшение отёчности подслизистой основы.

Таким образом, через десять суток после заражения состояние лёгких в обеих группах свидетельствовало о развитии интерстициальной пневмонии, расположенной преимущественно перибронхиально и периваскулярно. Воспаление, начавшись в эпителиальной стенке бронхиального дерева, постепенно переходило в более глубокие отделы респираторной части легкого. По сравнению с патоморфологическими изменениями, вызванными изолятом 2009 г. - штаммом *N13-2009* - у животных, инфицированных штаммом *KSH-2011*, на десятые сутки наблюдали меньшую площадь поражения лёгких и признаки репарации, которые очевидно указывали на более ранний процесс выздоровления.

Сравнительный анализ структурных изменений в головном мозге у экспериментальных животных при инфицировании штаммами вируса гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших во время пандемии 2009 г. и в постпандемический период в 2011 г. на территории Сибири. На первые сутки после инфицирования штаммами *N13-2009* и *KSH-2011* в обеих группах экспериментально зараженных животных в коре головного мозга отмечали небольшой периваскулярный отёк, при этом в субарахноидальном пространстве регистрировали значительные отёки.

На третьи сутки в головном мозге у всех экспериментальных мышей наблюдалось увеличение периваскулярных отёков (Рисунок 18 А, В), появлялись морфологические признаки развития воспалительного процесса в виде возникновения крупных очагов лейкоцитарной инфильтрации. Кровеносные сосуды были наполнены, сосудистые стенки выглядели более утолщенными по сравнению с контролем за счёт плазматического пропитывания. Отмечалось атипичное появление петехий (Рисунок 18 Г) и сетчатых отёков в ткани (Рисунок 19 А, Б). Большинство клеток микроглии находилось в состоянии функциональной активности. Процесс тигролиза распространялся на всё большее количество нейронов (Рисунок 18 Е), увеличивалось число клеточных некрозов (Рисунок 18 Б, В, Д).

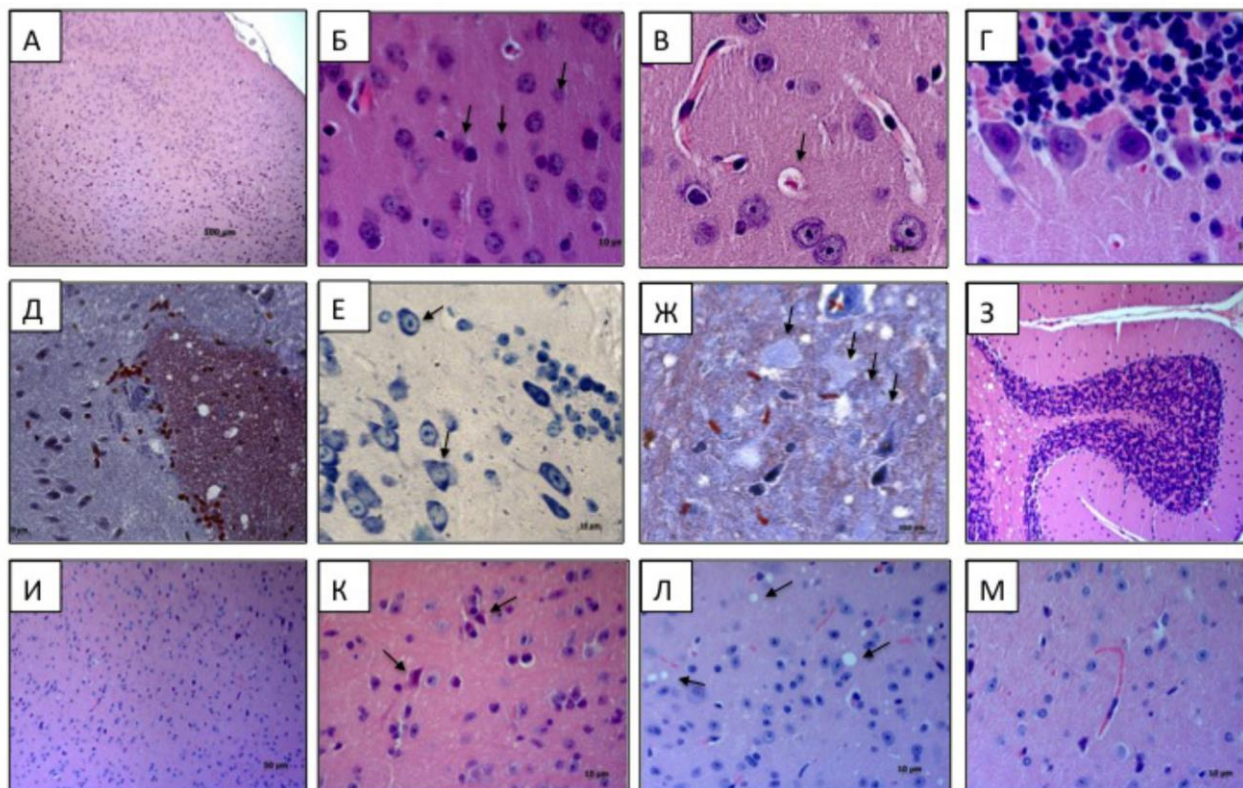


Рисунок 18. Патоморфологические изменения в коре головного мозга и мозжечке у экспериментальных мышей линии BALB/с под воздействием штамма вируса гриппа А(Н1N1)рdm09, выделенного в пандемический период 2009 года (N13-2009).

Примечание. Третьи сутки после заражения: А – отек в субарахноидальном пространстве головного мозга, Б – некроз в нейрональных клетках, В – сосудистый отек, Г – петехии в мозжечке, Д – очаги кровоизлияния вблизи субарахноидального пространства, Е – начало тигролиза в нейронах.

Десятые сутки после заражения: Ж – лизис клеток – последний этап некроза, З – отек в субарахноидальном пространстве и сетчатый отек в сером веществе мозжечка, И – многочисленные петехии в головном мозге, К – «тающие»-клетки, Л – сетчатый отек головного мозга, М – сладж эритроцитов.

Окраска гематоксилином и эозином (А-Г, З-М); по Маллори (Д, Ж); метиленовым синим (Е).

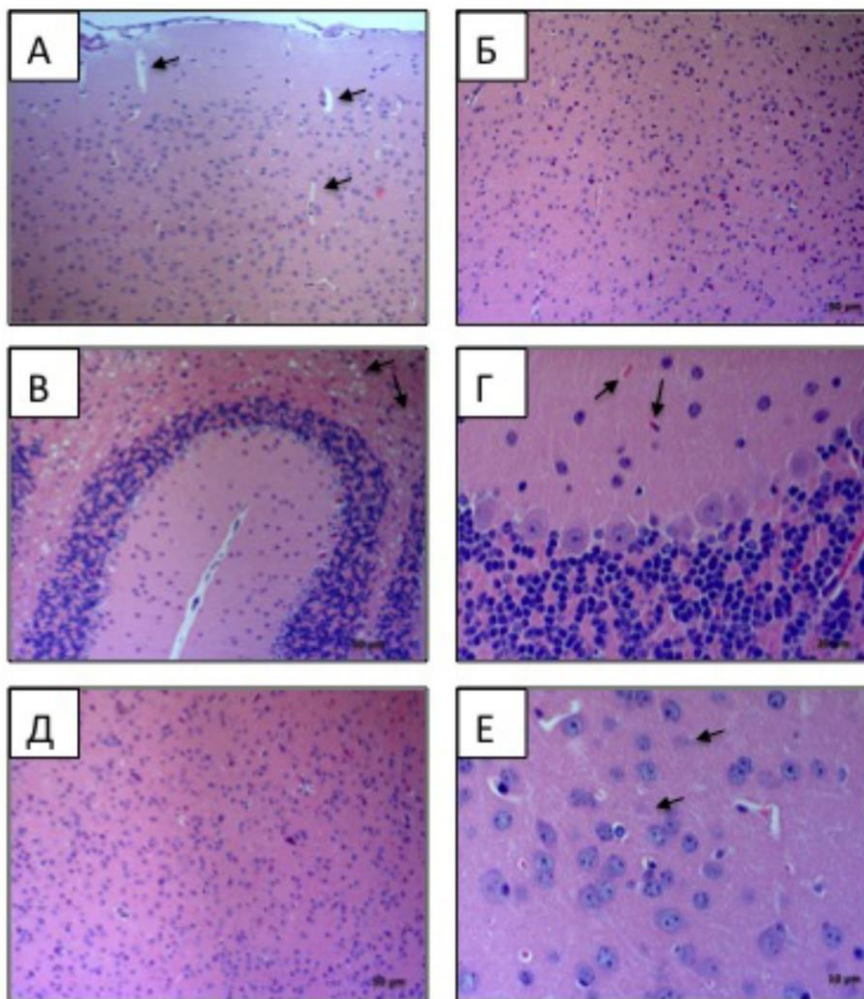


Рисунок 19. Патоморфологические изменения коры головного мозга и мозжечка у экспериментальных мышей линии BALB/c под воздействием штамма вируса гриппа A(H1N1)pdm09, выделенного в постпандемический период 2011 года (KSH-2011).

Примечание. Третьи сутки после заражения: А – сосудистый отёк коры головного мозга, Б - активация клеток микроглии, В – сетчатый отёк белого вещества головного мозга, Г - петехии в молекулярном слое коры мозжечка. Десятые сутки после заражения: Д - сосудистый отёк коры головного мозга, Е – клетки «тени» в коре головного мозга. Окраска гемотаксином и эозином.

Таким образом, через трое суток после заражения мышей штаммами вируса гриппа A(H1N1)pdm09 во всех экспериментальных группах отмечалось развитие инфекционного процесса.

На шестые сутки в субарахноидальном пространстве всех инфицированных мышей были выявлены очаги кровоизлияния. В группе

животных, зараженных штаммом *N13-2009*, отёк оболочки головного мозга имел генерализованный характер. Стенки кровеносных сосудов коры головного мозга по-прежнему были утолщены. Количество клеток, находящихся в состоянии некроза, визуально увеличивалось по сравнению с предыдущим сроком наблюдения в обеих группах инфицированных мышей, что указывает на нарастание патоморфологических изменений в мозговых структурах в ходе гриппозной инфекции.

На десятые сутки инфекции в головном мозге мышей, инфицированных штаммами *N13-2009* и *KSH-2011*, отмечены многочисленные петехии преимущественно в коре (Рисунок. 18 И). Клеточные некрозы приобретают вид «тающих» клеток (Науменко и Митяева, 1980) и клеток-«теней» (WEB проект: «Практика гистолога», 2014) и затрагивают не только нейроны, но и глиоциты коры головного мозга (Рисунок 18 Ж, К; Рисунок 19 Е). Возрастало количество очагов инфильтрации по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. В зернистом слое коры головного мозга мышей обеих групп регистрировались очаги сетчатого отёка (Рисунок 18 Л). В капиллярах был отмечен сладж эритроцитов (Рисунок 18 М). При сравнении изменений тканевых структур коры головного мозга мышей, инфицированных разными штаммами ВГ, отмечено, что под воздействием штамма *KSH-2011*, значительно чаще выявлялись сосудистые отёки (Рисунок 19 Д), в то время, как воспалительный процесс в целом более выражен под воздействием штамма *N13-2009*.

Патоморфологическое проявление вирусного воздействия прослеживалось также в мозжечке, которые характеризовались отёком в субарахноидальном пространстве, некрозом клеток Пуркинье и сетчатым отёком серого вещества (Рисунок 18 Г, З; Рисунок 19 В, Г).

Таким образом, при инфицировании пандемическими вирусами гриппа А(Н1N1)pdm09, у экспериментальных мышей развивалось нейротрофическое повреждение головного мозга. Патологические процессы имели более глубокий характер поражения в случае инфицирования штаммом *N13-2009*,

максимальное развитие которых приходилось на десятые сутки после заражения.

3.3 Сравнительное исследование патогенности вирусов гриппа А/Н5N1 и А(Н1N1)pdm09 (неадаптированный и адаптированный варианты)

В группе мышей линий BALB/c, инфицированных неадаптированным вариантом пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 штамм *Tomsk/2010*, регистрировали признаки заболевания с *третьих* по *шестые* сутки и они проявлялись снижением двигательной активности и ухудшением качества шерсти. Исход заболевания у всех мышей в этой группе был благополучным. Клинические признаки заболевания гриппом у мышей, инфицированных высокопатогенным ВГ А/Н5N1 штамм *Krasn/05* и адаптированным вариантом пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 штамм *MA-BALB/c*, были отмечены уже в *первые* сутки и проявлялись конъюнктивитами, снижением физической активности, снижением массы тела, ухудшением качества шерсти, одышкой, а к *десятым* суткам в обеих экспериментальных группах летальность составляла более 50%.

Результаты вирусологического анализа (Рисунок 20 А и Б) показали постепенное снижение титра вируса в легких мышей, инфицированных штаммом *Tomsk/2010*, что указывало на уменьшение вирусной продукции в лёгких мышей, в отличие от эффективно реплицирующегося ВПВГП А/Н5N1 (штамм *Krasn/05*), наибольшую концентрацию которого в лёгком отмечали с *третьих* по *десятые* сутки. Эти данные согласуются с результатами предыдущих исследований о том, что ВПВГП А/Н5N1 способен вызывать тяжёлую гриппозную инфекцию у экспериментальных мышей линии BALB/c без предварительной адаптации, в то время как пандемический вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 без предварительной адаптации не является патогенным и не вызывает гибели экспериментальных животных. Кроме того, репликация вируса

гриппа в органах головного мозга, печени и почек отмечена только под воздействием летальных штаммов - адаптированного варианта пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и ВПВГП A/H5N1.

Светооптическое исследование лёгких мышей выявило, что уже в *первые* сутки после заражения увеличилась гиперемия капилляров и секреция муцин-продуцирующих клеток бронхиального эпителия во всех исследуемых группах (Рисунок 21 А, Б, В; Рисунок 22 А, Б; Рисунок 23 А, Б, В). В случае заражения штаммом *Tomsk/2010* и штаммом *MA-BALB/c* (Рисунок 22 Б, 23 В) степень секреторной активности была значительно выше, чем в случае инфицирования штаммом *Krasn/05*. Вероятно, это связано с высоким титром штамма *Tomsk/2010* и штамма *MA-BALB/c* именно на начальном этапе воспаления в лёгких (Рисунок 20 А и 20 Б), а также с тропностью пандемического вируса A(H1N1)pdm09 именно к бронхиальному эпителию.

С *третьих* по *шестые* сутки у животных всех экспериментальных групп отмечали нарушение воздушности респираторной части лёгких по типу ателектазов (Рисунок 21 Г, Ж; 22 А, Г, Д; 23 Г, Ж). Наблюдали очаговую вакуолярную дистрофию бронхиального эпителия. Также регистрировали десквамацию эпителия средних и мелких бронхов (Рисунок 21 Г, Ж), которая была наиболее выражена под воздействием штамма *Tomsk/2010* (Рисунок 22 В). Кроме того, в лёгких мышей отмечали активную трансэпителиальную миграцию лимфоцитов, активированных макрофагов и гранулоцитов (Рисунок 21 Д, Е, З; 22 Г; 23 Д, Е, З, И). Резко увеличивалась секреторная активность муцин-продуцирующих клеток бронхиального эпителия. Накопление слизи отмечали как в мелких, так и в крупных бронхах.

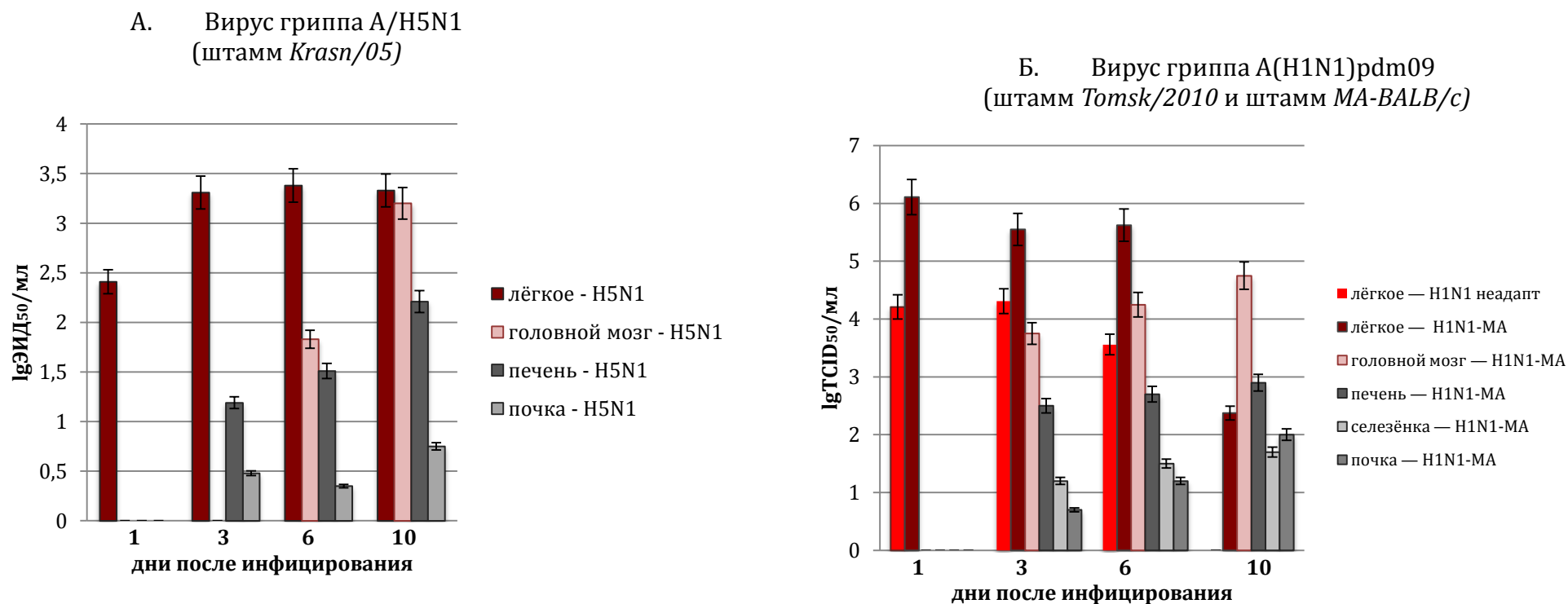


Рисунок 20. Репликация вируса в органах мышей, инфицированных высокопатогенным вирусом гриппа А/Н5N1 и пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 (неадаптированный и адаптированный варианты).

Примечание:

А. Группа мышей (n=24) была инфицирована штаммом *Krasn/05* (А/Н5N1 в дозе 5 МЛД₅₀ (мышинная летальная доза, применение которой вызывает гибель 50% животных) в объеме 50 мкл инфицирующей жидкости.

Б. Группа мышей (n=12) (на графике показана серым цветом) была инфицирована штаммом *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)* в дозе 6,38 lgTCID₅₀/ml (tissue culture infectious dose – инфекционная доза, заражающая 50% культуры клеток, выраженная в 1 мл) в объеме 50 мкл инфицирующей жидкости. Группа мышей (n=24) (на графике показана белым цветом) была инфицирована штаммом *MA-BALB/c*, адаптированным к мышам линии BALB/c в дозе 5 МЛД₅₀ в объеме 50 мкл инфицирующей жидкости.

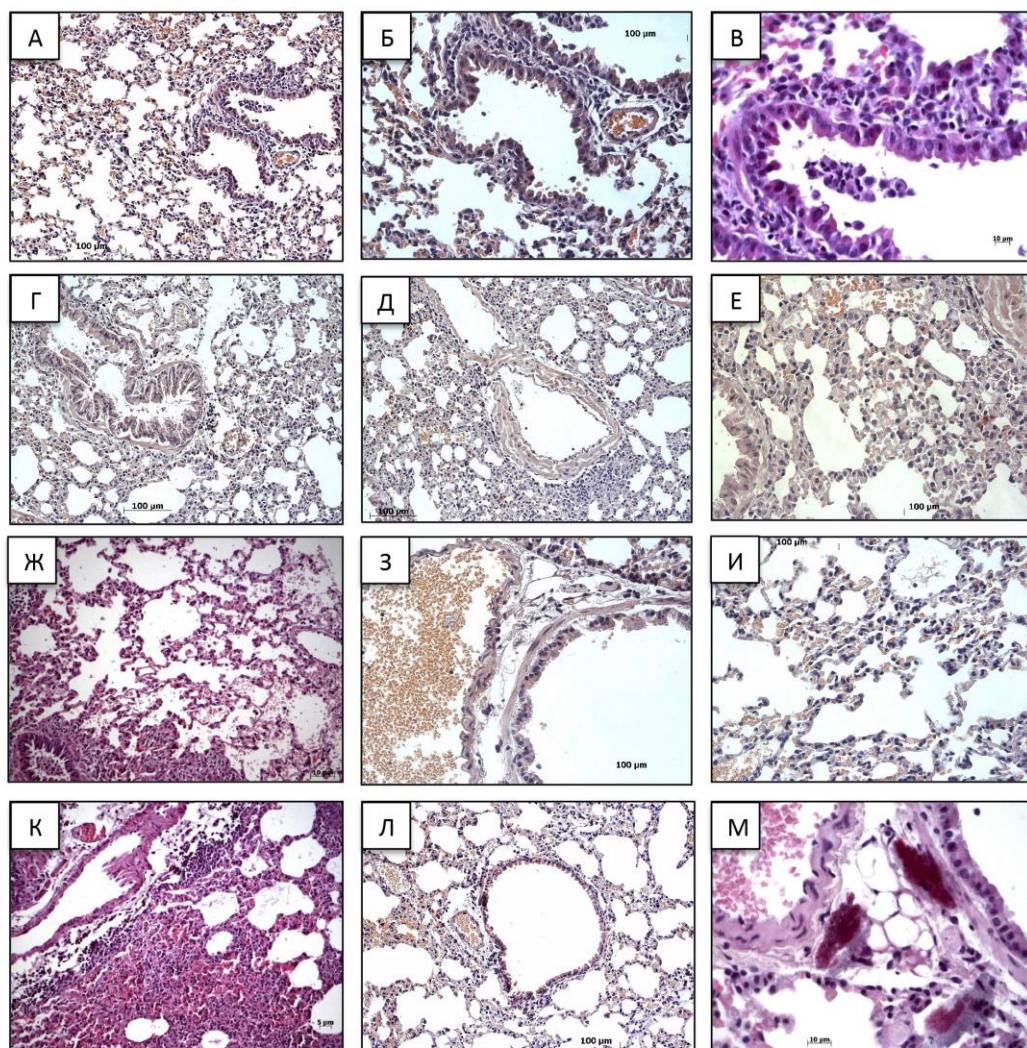


Рисунок 21. Структурные изменения в лёгких мышей линии BALB/c, инфицированных вирусом гриппа A/H5N1 штаммом *Krasn/05*.

Примечание: 1 сутки после заражения: А - кровенаполнение лёгочных капилляров; Б - усилена секреция бокаловидными клетками слизи; В - просвет бронха, содержащий слизь, активированные макрофаги и клеточный детрит. 3 сутки после заражения: Г, Д, Е - уменьшалась воздушность лёгких, за счёт усиления кровенаполнения капилляров и развития ателектазов. 6 сутки после заражения: Ж - крупные перибронхиальные и альвеолярные кровоизлияния, развитие интерстициальной пневмонии, локализованной преимущественно возле средних и мелких бронхов; З - бронхиальный эпителий частично разрушен, собственная пластинка оголена, в просвете крупного артериального сосуда пикноцитоз эритроцитов; И - в альвеолярных мешках клеточный детрит, эритроциты, активированные макрофаги. 10 сутки после заражения: К - интерстициальная пневмония, эмфизематозно расширенные участки, трансэпителиальный диapedез лимфоцитов; Л - уменьшение величины эпителия в крупных бронхах, оголена собственная пластинка; М - плазматическое пропитывание стенки кровеносного сосуда, множественные геморрагии. Окраска гематоксилином и эозином.

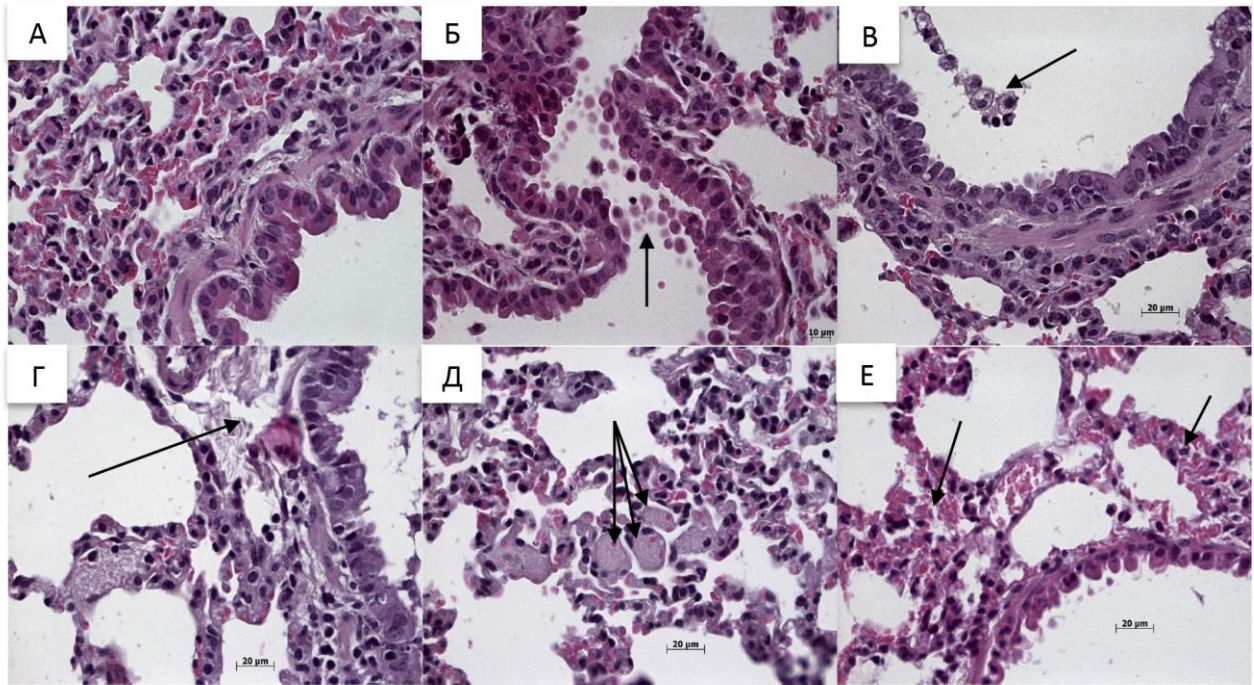


Рисунок 22. Структурные изменения в лёгких мышей линии BALB/c, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 штамм *Tomsk/2010*.

Примечание: 1 сутки после заражения: А - кровенаполнение мелких кровеносных сосудов. Б - просвет бронха, содержащий мукоцилиарный секрет и клеточные элементы. 6 сутки после заражения: В - в просвете бронха десквамированный эпителий и слизь, очаги некроза в интерстиции. Г - сливные некрозы. Д - фибриновые массы. 10 сутки после заражения. Е - стромальное изменение легкого. Окраска гематоксилином и эозином.

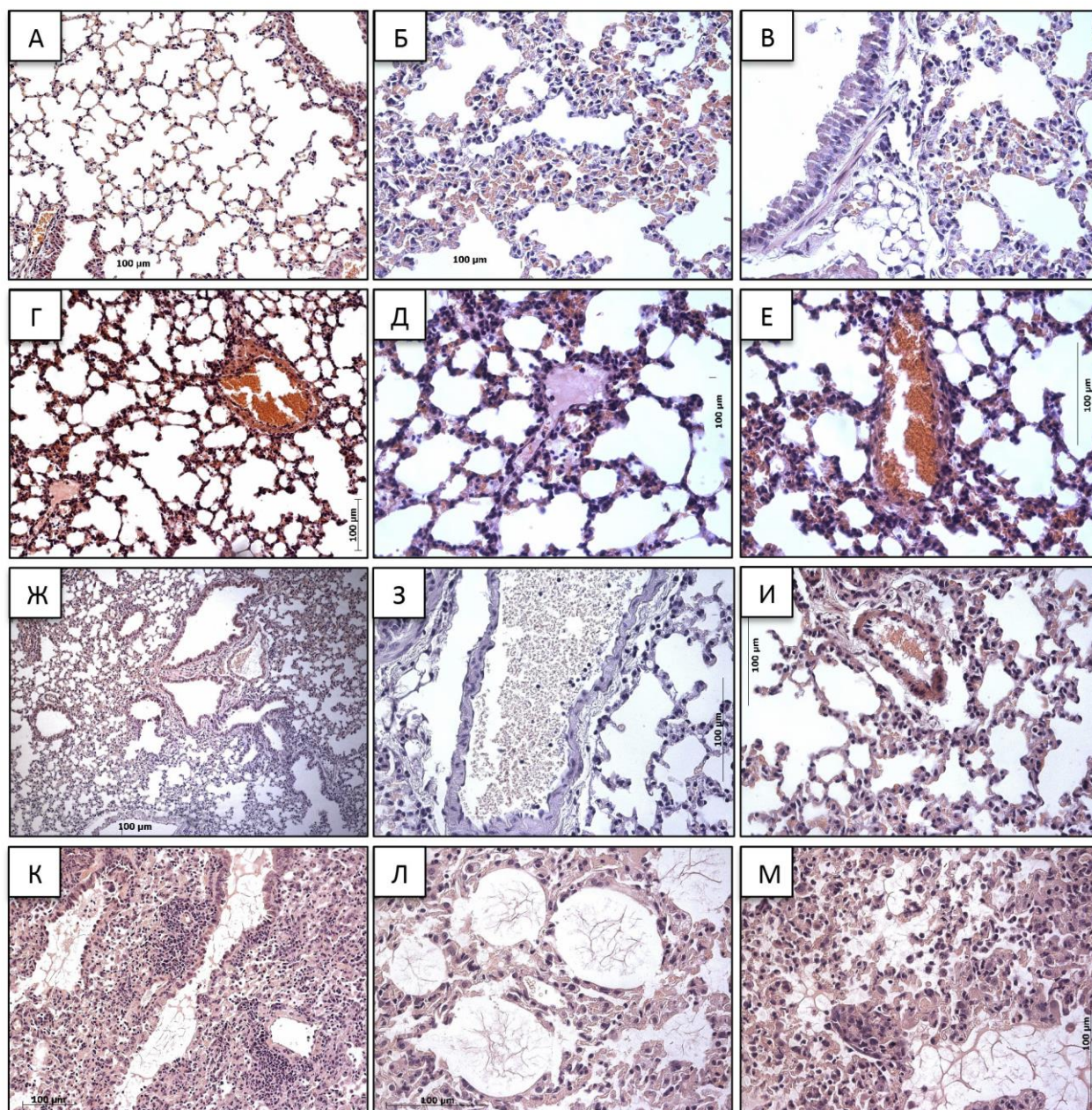


Рисунок 23 - Структурные изменения в лёгких мышей линии BALB/c, инфицированных адаптированным вариантом вируса гриппа A(H1N1)pdm09 штаммом MA-BALB/c.

Примечание. 1 сутки после инфицирования: А, Б, В - кровенаполнение капилляров больше выражено в нижних отделах респираторной части лёгких; 3 сутки после инфицирования: Г, Д, Е - эритроцитарный сладж в крупных сосудах, выпотевание белков плазмы крови. 6 сутки после инфицирования - Ж, З, И - полнокровие респираторной части, эритроцитарный сладж и пикноцитоз эритроцитов. 10 сутки после инфицирования: К -резкое снижение воздушности за счет развития интерстициальной пневмонии; Л, М - эмфизематозно расширенные участки альвеол с содержащимися в просветах нитями фибрина и клеточным детритом. Окраска гематоксилином и эозином.

К шестым суткам после инфицирования у всех экспериментальных животных отмечали гемолиз эритроцитов в мелких кровеносных сосудах (Рисунок 21 З; 23 З, И). Встречались явления микротромбоза (Рисунок 22 Г, Д). Кроме того, отмечались и другие макро- и микроскопические признаки, часто обнаруживаемые при ДВС-синдроме, среди которых - резкое полнокрое, сосудистый отёк, скопление альвеолярных макрофагов, кровоизлияния в альвеолы, образование фибриновых масс и геморрагии (Рисунок 21, 22, 23). Во всех экспериментальных группах животных был обнаружен сладж эритроцитов.

У мышей, инфицированных штаммом *Krasn/05* и штаммом *MA-BALB/c* на шестые сутки после инфицирования отмечали пикноцитоз (эритроциты с «шиловидными отростками») (Рисунок 21 З, 23 З), чего не наблюдали в лёгких мышей, инфицированных штаммом *Tomsk/2010* в течение всего срока наблюдения. К концу первой недели наблюдений у мышей линии *BALB/c*, инфицированных штаммом *Krasn/05* и штаммом *MA-BALB/c*, отмечали развитие интерстициальной пневмонии (Рисунок 21 Ж, 23 Ж).

На десятые сутки постинфекционный лёгочный рисунок у мышей инфицированных штаммом *Krasn/05* и штаммом *MA-BALB/c* изменялся за счёт многоочаговых крупных фокусов воспаления, отмечали развитие интерстициальной пневмонии (Рисунок 21 К, 23 К). А в группе мышей инфицированных штаммом *Tomsk/2010* воспалительный процесс был, преимущественно, выражен бронхитом с локальными участками воспаления интерстиция (Рисунок 22 Е).

При исследовании с помощью электронного микроскопа особенностей топологии ВПВГП А/Н5N1 и пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 в лёгких мышей, инфицированных штаммом *Krasn/05* и штаммом *MA-BALB/c*, на первые сутки выявили ассоциацию и отшнуровку вирионов на поверхности альвеолоцитов (Рисунок 24 А, 25 А). Ядра альвеолоцитов неправильной формы, гетерохроматин образовывал глыбки, центры репродукции вируса обнаруживались преимущественно в альвеолоцитах 2-го типа. Цитоплазма

содержала множество везикулярных структур, большое количество свободных и прикрепленных к немногочисленным профилям эндоплазматической сети полисом с признаками образования нуклеопротеидных тяжей, разрушенные митохондрии. Альвеолярные макрофаги находились в состоянии активного фагоцитоза. Границы клеток значительно изрезаны. Ядра неправильной формы, содержали небольшое количество пристеночно расположенного гетерохроматина, много вироплазмы и редкие полные нуклеокапсиды.

По данным электронной микроскопии с *первых суток* после инфицирования мышей ВПВГП А/Н5N1 и пандемическим А(Н1N1)pdm09 (неадаптированный и адаптированный варианты), отмечали более сохранное состояние клеток лёгких в группе мышей, зараженных неадаптированным вариантом - штамм *Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)* - по сравнению с воздействием двух других штаммов - *A/goose/Krasnoozerskoye/627/05* и *MA-BALB/c* (Рисунок 24 А, 25 А, 26 А). Основные изменения в лёгком сводились к следующему: в просвете альвеолярных мешков были видны сферические вирусные частицы, клеточные остатки; в цитоплазме альвеолоцитов 1-го типа и макрофагах наблюдали вирусные частицы сферической и нитевидной формы, вироплазму; в альвеолоцитах 2-го типа разрушенные гранулы с сурфактантом, много миелиноподобных фигур (цитосегресом). Некоторые клетки этого типа имели хорошо сохранённую структуру, однако, в их цитоплазме содержались вирусные частицы; от поверхности альвеолоцитов наблюдали отшнуровывание вирусных частиц; в цитоплазме альвеолярных макрофагов в области ЭПС регистрировали образование вирусных масс.

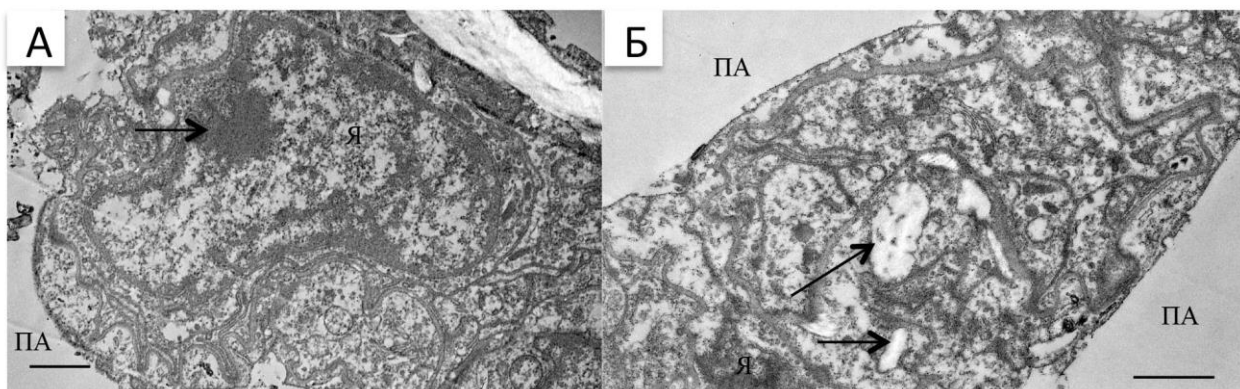


Рисунок 24. Изменения ультраструктур клеток лёгких мышей линии BALB/c, инфицированных вирусом гриппа A/H5N1 штаммом *Krasn/05*.

Примечание: А – на 1-е сутки видны глыбки гетерохроматина на периферии ядра (стрелка) (ПА – полость альвеолы; Я – ядро); Б – на 3-и сутки отмечается вакуолизация клетки альвеолярного эпителия (стрелка). Бар соответствует 1 мкм.

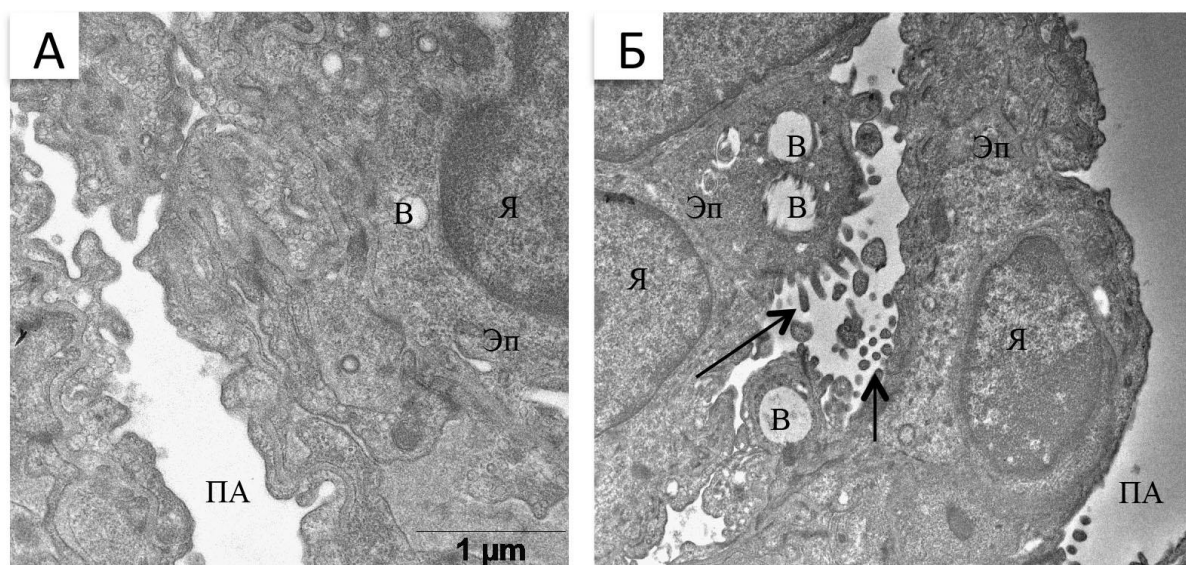


Рисунок 25. Изменения ультраструктур клеток лёгких мышей линии BALB/c, инфицированных неадаптированным вариантом вируса гриппа A(H1N1)pdm09 штаммом *Tomsk/2010*.

Примечание: А – на 1-е сутки отмечали умеренную вакуолизацию (В - вакуоль; ПА – полость альвеолы; Эп – эпителий; Я – ядро); Б – на 3-и сутки отмечали вакуолизацию клетки альвеолярного эпителия, регистрировали отпочковывающиеся вирионы в альвеолярной полости (стрелка). Бар соответствует 1 мкм.

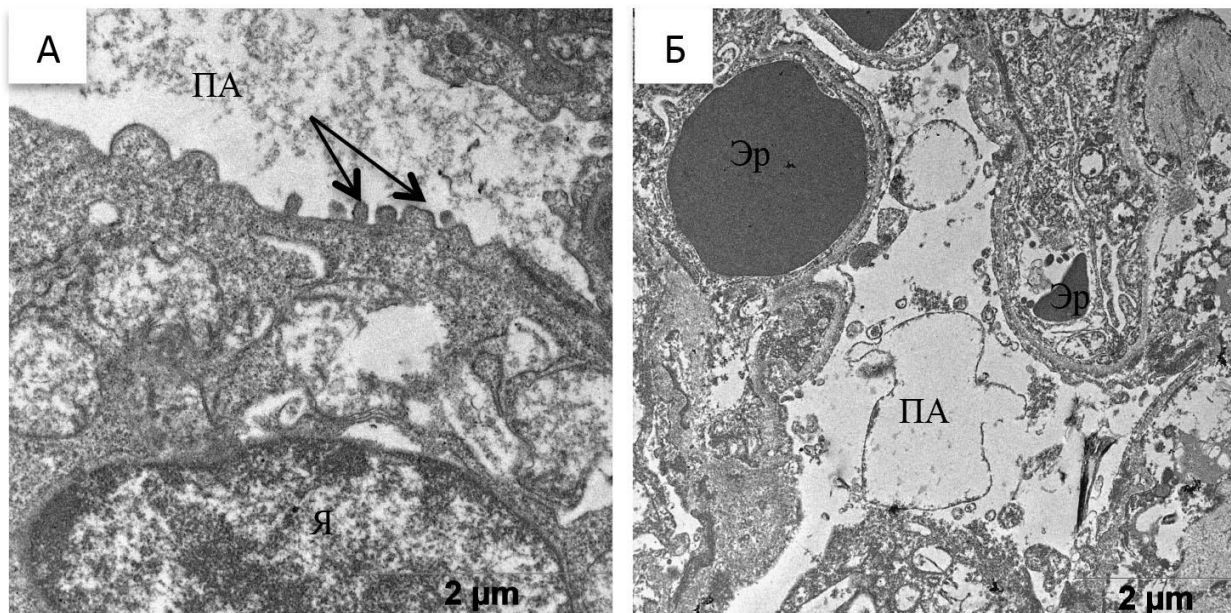


Рисунок 26. Изменения ультраструктур клеток лёгких мышей линии BALB/c, инфицированных адаптированным вариантом вируса гриппа A(H1N1)pdm09 штаммом MA-BALB/c.

Примечание: А – на 1-е сутки отмечали отпочковывание вирионов с поверхности альвеолоцитов 2 порядка (ПА – полость альвеолы; Я – ядро); Б – на 3-и сутки отмечали клеточный детрит в альвеолярной полости, дистрофию альвеолярного эпителия. Бар соответствует 1 мкм.

На третьи сутки в лёгких мышей трёх экспериментальных групп процесс деструкции тканевых структур усугублялся: наблюдалось утолщение эластических мембран, кровоизлияния в строму (Рисунок 24 Б, 25 Б, 26 Б). Просветы альвеолярных мешков сужены, заполнены хлопьевидным содержимым. Значительно страдали альвеолоциты 2-го типа: появлялись клетки, находящиеся в состоянии некроза, в которых имелась вироплазма, электронноплотные миелиноподобные структуры. Лёгочные альвеолярные перегородки были утолщены в результате их отёка. Появлялись очаги кровоизлияний и некроза, в которых обнаруживалось небольшое количество вируса. В группе мышей, инфицированных ВГ A/H5N1 и адаптированным вариантом A(H1N1)pdm09, отмечали значительное повреждение кровеносной системы лёгких: в капиллярах встречались окклюзии клеточным детритом,

фибрином, тромбоцитами, сетевидными структурами и гемолизированными эритроцитами, наблюдали признаки начинающейся склеротизации (Рисунок 24 Б, 26 Б).

К шестым суткам лёгкие у мышей трёх экспериментальных групп значительно повреждены по сравнению с предыдущим сроком исследования. Однако степень поражения лёгких была наиболее выражена под воздействием летальных штаммов (*Krasn/05* и *MA-BALB/c*). Регистрировали множественные очаги некрозов, увеличивалось количество фиброзных структур. В зоне некрозов появлялись клетки фибробластического ряда, кристаллоидные структуры и коллагеновые волокна. По-прежнему регистрировали много вируса в альвеолоцитах и в межклеточном пространстве. Картины отшнуровки вируса у животных, инфицированных вирусом А/Н5N1 и адаптированным вариантом А(Н1N1)pdm09, отмечались чаще, чем в группе животных, инфицированных неадаптированным вариантом ВГ А(Н1N1)pdm09.

Таким образом, воспалительный процесс в лёгких мышей, вызванный неадаптированным вариантом пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 по сравнению с ВПВГП А/Н5N1 и с адаптированным вариантом пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 характеризовался более поздним проявлением вирулентного эффекта и меньшим повреждением респираторной ткани, не вызывая при этом летального исхода среди экспериментальных мышей линии BALB/c. При заражении мышей ВПВГП А/Н5N1 и адаптированным вариантом ВГ А(Н1N1)pdm09 регистрировали развитие интерстициальной пневмонии и ДВС-синдром, приводивших к гибели животных.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование по изучению адаптации пандемического вируса гриппа на примере штамма *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)* (*Tomsk/2010*) было выполнено на двух инбредных линиях мышей - BALB/c и C57Bl/6z - и на аутбредных мышах CD1. В результате проведённых экспериментов были получены три адаптированных к мышам высоковирулентных штамма, вызывающих тяжёлое заболевание и гибель экспериментальных животных:

- *A/Tomsk/273-MA1/2010(H1N1pdm09)* (*MA-BALB/c*), полученный путём адаптации к мышам линии BALB/c и прошедший 7 пассажей через лёгкие.
- *A/Tomsk/273-MA2/2010(H1N1pdm09)* (*MA-C57Bl/6z*), полученный путём адаптации к мышам линии C57BL/6z, прошедший 12 пассажей через лёгкие.
- *A/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09)* (*MA-CD1*), полученный путём адаптации к мышам CD1 и прошедший 10 пассажей через лёгкие.

При сравнении вирусной нагрузки на лёгкие трёх адаптированных вариантов ВГ в сравнении с исходным ВГ *A(H1N1)pdm09* (штамм *Tomsk/2010*) не было выявлено достоверных изменений. Данный факт свидетельствует о том, что при проведении слепых пассажей через лёгкие экспериментально инфицированных мышей происходит увеличение вирулентных свойств у адаптированных вариантов, не зависящее от увеличения титров вирусов. Очевидно, что на усиление вирулентных и патогенных свойств влияет изменение генома ВГ.

Анализ аминокислотных последовательностей пандемического ВГ дикого типа (штамм *Tomsk/2010*) и его адаптированных вариантов (штамм *MA-BALB/c*, штамм *MA-C57Bl/6z* и штамм *MA-CD1*) показал различия по шести белкам НА, NA, NP, NS2, PB2, PB1 и наличие потенциальной экспрессии факультативного

неструктурного белка PB1-F2. Всего было обнаружено 19 аминокислотных замен. Нами было выявлено, что наиболее близкими по аминокислотному составу оказались штаммы, полученные путём адаптации на линейных мышах - *MA-BALB/c* и *MA-C57Bl/6z*. С помощью литературных источников в трёх адаптированных штаммах ВГ были выявлены аминокислотные замены, отвечающие за усиление патогенности и адаптацию к животным: в белке PB2 (G158E, T271A+590S/591R), в белке PA (295P), в белке HA (100I), в белке NS1 (I123V). Замены в белках NP (N375D), NS2 (M235V) и в белках полимеразного комплекса: PB1 (L50S, S233R, R586K, P605H), PB2 (G158E, S279F, S317L, R482K, T689A, I690V) также, вероятно, способствовали увеличению патогенности во время адаптации дикого типа пандемического ВГ штамм *Tomsk/2010*. Кроме того, во всех трёх адаптированных вариантах отмечена возможность экспрессии белка PB1-F2, который является факультативным неструктурным белком и обнаруживается не у всех ВГА. Он играет роль в увеличении патогенности, вызывая апоптоз клеток-хозяина и разрушая альвеолярные макрофаги. Также данный белок опосредованно регулирует полимеразную активность, находясь в комплексе с белком PB1, и влияет на иммунный ответ (Hale et al., 2010; Varga and Paleze, 2011).

Нами было обнаружено, что во всех исследуемых штаммах отмечается лекарственная устойчивость к занамивиру благодаря мутации в белке NP (E119V) и к озельтамивиру за счет мутаций в белке NA (V106I, N248D). Данный спектр полученных нами адаптированных вариантов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к генетически различным лабораторным животным расширяет возможности оценки эффективности противогриппозных препаратов.

Кроме того, во всех адаптированных вариантах пандемического ВГ A(H1N1)pdm09 были обнаружены одинаковые мутации, которые, вероятно, также отвечают за усиление вирулентности во время адаптации к экспериментальным животным. Мы предполагаем, что такими а.к. заменами являются: в белке PB2 (S317L; R482K; T689A; I690V), в белке HA (E172G, G239D), в белке NP (N375D),

в белке NA (I357V; L443I; T467I), в белке NS2 (M235V, A236V). Однако среди опубликованной литературы нами не было обнаружено подтверждающей или опровергающей данный факт информации. На настоящий момент известно ограниченное количество работ, посвященных изучению адаптации пандемического вируса гриппа (Киселев и Львов 2012; Rolling et al., 2009; Plyushina et al., 2010; Xu et al., 2011; Sakabe et al., 2011; Garigliany et al., 2010; McHugh et al., 2013). В большинстве экспериментов используются мыши линии BALB/c и пандемические штаммы, близкие по аминокислотному составу таким штаммам, как A/California/01/2009(H1N1)pdm09 и A/California/07/2009(H1N1)pdm09, однако, во всех случаях в результате адаптации регистрируются новые мутации, приводящие к летальному исходу экспериментальных животных (Rolling et al., 2009; Plyushina et al., 2010; Xu et al., 2011).

Молекулярные механизмы, с помощью которых пандемический вирус гриппа 2009 года смог адаптироваться к популяции человека и быстро распространиться среди людей, до сих пор остаются неизвестными. Однако, лабораторные эксперименты, посвященные изучению адаптации пандемического ВГ A(H1N1)pdm09, позволяют подойти к решению актуальной фундаментальной задачи – определению генетических маркёров вирулентности, роли отдельных генов в патогенезе гриппозного заболевания, а также выявлению молекулярных основ преодоления межвидового барьера. Таким образом, полученные нами данные в ходе эксперимента по адаптации предоставляют дополнительную информацию о молекулярных маркёрах патогенности вируса гриппа А на примере субтипа A(H1N1)pdm09. Кроме того, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при благоприятных условиях пандемический вирус гриппа A(H1N1)pdm09 способен достаточно быстро адаптироваться к той популяции животных, в которой он циркулирует, вызывая в результате 100% гибель инфицированных особей.

При сравнении биологических свойств у трёх полученных нами адаптированных вариантов пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 была выявлена бóльшая степень вирулентности, выраженная в LD₅₀, у штамма *МА-BALB/c*, а наименьшая степень вирулентности - у штамма *МА-C57Bl/6z*. Полученные данные свидетельствуют о правомерности использования в качестве модельных животных для изучения гриппозной инфекции мышей линии BALB/c и C57Bl/6z, а также аутбредных мышей CD1. При этом по результатам нашего исследования отмечено, что наиболее реактивной к ВГ является линия мышей BALB/c.

Для изучения внутривидовой изменчивости по устойчивости к адаптированному варианту пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 было проведено перекрёстное инфицирование мышей двух различных генетических линий, при котором мышей линии BALB/c заражали штаммом *МА-C57Bl/6z*, а мышей линии C57Bl/6z - штаммом *МА-BALB/c*. Результаты эксперимента показали, что вариант пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09, адаптированный к мышам линии BALB/c, является высоковирулентным для всех инбредных мышей, использованных в эксперименте - BALB/c и C57Bl/6z. В то время как штамм *МА-C57Bl/6z* оказался высоковирулентным только для мышей линии C57Bl/6z, к которым был адаптирован, и низковирулентным для мышей другой инбредной линии - BALB/c. Анализ аминокислотных различий двух штаммов *МА-BALB/c* и *МА-C57Bl/6z* выявил только одну замену в белке полимеразного комплекса PB2 (S279F). Ввиду этого, можно предположить, что наличие аминокислоты Ser в положении 279 белка PB2, а также комплекс других замен в структурных и факультативном белках, совокупно отвечают за высоковирулентным свойства адаптированного варианта пандемического вируса гриппа, которые проявляются на различных линиях мышей. Кроме того, анализ опубликованной литературы позволяет нам сделать вывод о том, что проведенное перекрёстное инфицирование мышей двух различных генетических линий адаптированными вариантами пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 на настоящий момент выполнено впервые.

Гистологическое сравнение лёгких мышей линии BALB/c, полученных на этапе первого и седьмого пассажей во время адаптации пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 штамма *Tomsk/2010*, показало выраженные патологические изменения уже на стадии первого пассажа, которые проявлялись сладжем эритроцитов в сосудистом русле и плазматическим пропитыванием кровеносных сосудов с формированием гиалиноподобных (фибриновых) мембран. Последний факт, вероятно, отрицательно сказывался на кровоснабжении лёгкого и способствовал развитию ДВС-синдрома. В лёгких, полученных на этапе седьмого пассажа под воздействием адаптированного варианта пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 штамма *MA-BALB/c*, регистрировали резкое снижение воздушности респираторной части на фоне развития интерстициальной пневмонии. Под воздействием другого адаптированного варианта пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09, полученного к инбредным мышам линии C57Bl/6z - штамм *MA-C57Bl/6z*, в лёгких также регистрировали развитие интерстициальной пневмонии. По литературным данным аналогичные патологические процессы приводят к летальным исходам экспериментально инфицированных млекопитающих (Киселев и Львов 2012; Rolling and Garigliany et al., 2010; McHugh et al., 2013). Исходя из этого можно предположить, что результатом воздействия адаптированного варианта вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 на лёгкие млекопитающих является развитие такого тяжёлого и высоколетального заболевания как интерстициальная пневмония.

Ультраструктурный анализ изменений клеток лёгких мышей линии BALB/c под воздействием неадаптированного варианта пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *Tomsk/2010*), по сравнению с состоянием клеток мышей, инфицированных адаптированным вариантом пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *MA-BALB/c*), выявил следующие различия:

- уже на *первые* сутки после инфицирования в лёгких мышей обеих групп отмечали в цитоплазме альвеолоцитов локальные участки расплавления, приводящие к развитию баллонной дистрофии. При

этом наибольшая сохранность эпителиальных клеток регистрировалась у мышей, инфицированных неадаптированным вариантом пандемического ВГ А(H1N1)pdm09;

- к *третьим* суткам в клетках лёгких продолжалось развитие альтерации и увеличение вирусной массы за счет его репродукции в паренхиматозных клетках. В целом в клетках мышей обеих групп отмечали усугубление патологического процесса, ярче выраженного под воздействием штамма *МА-BALB/c*;
- на *шестые* сутки под воздействием неадаптированных и адаптированных вариантов пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 регистрировали наличие активной вирусной продукции в альвеолоцитах 1-го и 2-го типов. При этом под воздействием штамма *МА-BALB/c* центры репродукции вируса преимущественно обнаруживали в альвеолоцитах 2-го типа, а также регистрировали большое количество вироплазмы в альвеолярных макрофагах.

Таким образом, адаптированный вариант пандемического вируса гриппа типа А(H1N1)pdm09 проявлялся значительным патогенным эффектом на субклеточные структуры лёгких при интраназальном заражении мышей линии BALB/c по сравнению с воздействием неадаптированного варианта. При этом центры репродукции вируса отмечались преимущественно в альвеолоцитах 2-го типа, а также регистрировали большое количество вироплазмы в альвеолярных макрофагах, что, вероятно, влияет на нарушение наработки сурфактанта и поражение собственной макрофагальной системы, в результате которых изменяется поверхностно-активное натяжение в альвеолах, приводящее к их спадению, а также дисфункции фагоцитарной активности.

В ходе нашего исследования были проанализированы особенности влияния неадаптированного варианта вируса гриппа А(H1N1)pdm09 на внутренние органы (головной мозг, печень, почку, тонкую кишку) у экспериментальных мышей

линии BALB/c в сравнении с воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09, на примере штаммов *Tomsk/2010* и *MA-BALB/c*, соответственно.

Вирусологические и иммуногистологические данные показали наличие вирусного титра в головном мозге только под воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09. Гистологическими методами было выявлено большее кровенаполнение сосудов головного мозга по всей площади коры под воздействием штамма *MA-BALB/c*. А в сосудистых капиллярах выявлялся сладж эритроцитов. Кроме того, было зарегистрировано достоверное увеличение диаметра сосудов коры головного мозга. Апоптозы нейронов также как и в группе сравнения были представлены апоптотическими тельцами, клетками «теней» и «тающими» клетками (Науменко и Митяева, 1980), их количество было достоверно больше, по сравнению с аналогичными параметрами в группе мышей, инфицированных неадаптированным вариантом ВГ А(Н1N1)pdm09. Вероятно, поражение мозга, обнаруженное в данном исследовании, следует трактовать как энцефалит, однако многие аспекты структурных изменений нуждаются в дальнейшем изучении. Существуют несколько гипотез о проникновении вируса гриппа в ЦНС. Одна из них предполагает преодоление вирусом гематоликворного барьера (ГЛБ) посредством разрушения эндотелия или через поры между эндотелиоцитами капилляров сосудистого сплетения (Ha-Lee et al., 1995; Chaves et al., 2011). Известно, что в клеточных элементах ЦНС содержатся Sia α 2-3Gal и Sia α 2-6Gal рецепторы, восприимчивые к ВГ, что может способствовать наработке новых вирусных частиц (В.Г.Науменко, Н.А.Митяева, 1980). В. А. Цинзерлинг и соавт. показали, что вирусные антигены (НА и NP) могут локализоваться в кровеносных сосудах и веществе мозга как в культуре клеток эндотелия кровеносных сосудов человека, так и в тканях человека (Цинзерлинг и др., 2011). С помощью электронномикроскопического метода в ультраструктурах головного мозга мышей, инфицированных штаммом *MA-BALB/c*, в первую очередь были зарегистрированы поражения митохондрий, которые являются наиболее лабильными структурами клетки и первыми подвергаются изменениям при

патологических состояниях и гиперфункции. Наиболее частые ультраструктурные изменения были представлены в виде набухания органелл, просветления и гомогенизации матрикса, фрагментации и гомогенизации крист вплоть до разрушения наружной мембраны. Обратимый характер имеет лишь часть подобных изменений (набухание и частичная фрагментация), в то время как более выраженные деструктивные изменения носят необратимый характер (Серов и Пауков, 1975). Кроме того, нам удалось обнаружить в ультраструктурах головного мозга мышей, инфицированных штаммом *MA-BALB/c*, преимущественную продукцию вирусных частиц в эпендимной глии, участвующей в составе гематоликворного барьера (ГЛБ). Что может говорить о вероятном проникновении адаптированного варианта вируса гриппа в ЦНС через структуры ГЛБ. Таким образом, полученные нами данные позволили сделать предположение о нейротрофическом повреждающем действии адаптированного варианта пандемического вируса гриппа на структуры клеток головного мозга.

Отмечено, что в головном мозге мышей при инфицировании штаммом *MA-BALB/c* образовывались вирионы нитевидной формы. Известно, что вирусы гриппа могут принимать две различные морфологические формы - нитевидные или шаровидные (Neumann et al, 2009; Seladi-Schulman, Steel and Lowen, 2013). Хотя функциональное значение каждого типа вириона в настоящее время окончательно не выяснено, но предполагается, что нитевидная форма обычно наблюдается при инфицировании первичными или низкопатогенными изолятами ВГА субтипа H1N1, а сферическая форма вирионов - при инфицировании также первичными или лабораторно-адаптированными штаммами (Seladi-Schulman, Steel and Lowen, 2013).

В печени с помощью вирусологических и иммуногистохимических методов была выявлена вирусная продукция в случае инфицирования адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа - штаммом *MA-BALB/c*. Только под влиянием адаптированного варианта вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в печени мышей линии BALB/c регистрируется достоверное уменьшение величины

гепатоцитов. Данные структурные изменения, вероятно, объясняются усиленной работой гепатоцитов в ответ на патогенное действие ВГ, что вызывает истощение функциональных клеток печени. При этом отмечается усиление кровоснабжения органа и достоверное увеличение диаметров синусоидных капилляров по сравнению со аналогичными структурами в печени у мышей группы сравнения.

В почке с помощью вирусологических и иммуногистохимических методов была выявлена вирусная продукция в случае инфицирования адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа - штаммом *МА-BALB/c*. Характерное накопление окраски регистрировалось в собирательных трубочках коркового вещества почек. А в мозговом веществе почки отмечалось достоверное увеличение диаметра собирательных трубочек, по сравнению с аналогичными структурами в почках мышей, инфицированных неадаптированным вариантом пандемического ВГ.

В тонком кишечнике не было выявлено накопления вирусной продукции с помощью вирусологических методов, однако при использовании иммуногистохимического метода отмечено характерное накопление окраски в апикальной части ворсин тонкого кишечника. Морфометрический анализ выявил достоверное уменьшение среднего количества бокаловидных клеток под воздействием как неадаптированного, так и адаптированного вариантов пандемического ВГ. При этом в обеих экспериментальных группах отмечали достоверное увеличение высоты каёмчатого эпителия. Вероятно, последний факт объясняется численным сокращением бокаловидных клеток, при котором возрастает функциональная нагрузка на клетки каёмчатого эпителия, что отражается в виде увеличения размеров клеток на 3-и сутки после инфицирования.

Полученные нами результаты требуют дальнейшего изучения вопроса, поскольку анализ литературы не выявил информации, подтверждающей или опровергающей нашу гипотезу о влиянии адаптированного варианта пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 на такие внутренние органы

мышей линии BALB/c как печень, почку и тонкую кишку. Кроме того, нами было отмечено уменьшение высоты ворсин и крипт под воздействием неадаптированного и адаптированного вариантов пандемического ВГ, по сравнению с контролем, что, вероятно, объясняется структурными изменениями в подслизистом и мышечном слоях тонкого кишечника.

Использованные в работе по изучению адаптации вируса гриппа родительский штамм *Tomsk/2010* и его три адаптированных варианта - *MA-BALB/c*, *MA-C57Bl/6z* и *MA-CD1* - депонированы в GenBank, а также в Музей вирусов гриппа и ОРЗ ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ (г. Санкт-Петербург) (приложение № 2).

С целью изучения биологических свойств штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших во время пандемии 2009 г. и в постпандемический период в 2011 г. на территории Сибири, были выбраны на основании сходных характеристик по антигенным и молекулярно-биологическим свойствам внутри своих групп два штамма - *N13-2009* и *KSH-2011*, соответственно. Обнаружено, что оба штамма эффективно реплицировались в лёгких мышей без предварительной адаптации. Титры вируса в лёгких при инфицировании штаммом *N13-2009* регистрировали с *первых по шестые* сутки аналогично штамму *KSH-2011*. Однако отмечено, что в *первые* сутки в лёгких показатели титра вируса штамма 2009 г. были достоверно выше по сравнению со штаммом, циркулировавшим в постпандемический период. Морфологическое исследование подтвердило вирусологические данные об эффективной репликации в лёгких штаммов А *N13-2009* и *KSH-2011*. Нами отмечено, что уже к *шестым* суткам развивается острое инфекционное заболевание - интерстициальная пневмония. Воспалительный процесс начинается в эпителиальной ткани крупных и средних бронхов, а затем переходит в интерстициальную ткань. Несмотря на то, что в обеих группах регистрируется интерстициальная пневмония, преимущественно перибронхиальной формы, в целом воспалительный процесс тяжелее протекает в случае инфицирования штаммом 2009 года.

Анализ аминокислотных замен у исследуемых штаммов выявил различия в генах HA и NA по сравнению со штаммом сравнения - *A/California/07/2009*. У штамма *N13-2009* обнаружены три аминокислотные замены в антигенном сайте гемагглютинаина Ca: I166T, S203T, R205K; и две в нейраминидазе: V106I, N248D. В то время как у штамма *KSH-2011* аминокислотных замен существенно больше: в субъединице HA1 - S143G, A197T, K211N, A215E, в том числе, в антигенных сайтах - (Ca) S203T, (Cb) L70P, (Sb) S185T; в субъединице HA2 - E374K, S451N; и в NA: V106I, N248D. Нами отмечено, что из всех аминокислотных замен, появившихся в 2009 году в антигенном сайте Ca, закрепились только S203T, став одной из характерных мутаций среди штаммов, выделенных на территории РФ в 2011 году (Prokoreva et al., 2013). По мнению Morlighem et al., данная мутация, также как и аминокислотная замена в гене NA - N248D, являются одними из главных несинонимичных замен, характерных для A(H1N1)pdm09 (Morlighem et al., 2011). Кроме того, характерными аминокислотными заменами для всех пандемических ВГ A(H1N1)pdm09, выделенных в 2011 году, являются: в субъединице HA1 - S143G, A197T, в том числе, в антигенном сайте - S185T (Sb); в гене NA - V106I, N248D (И.М. Сулопаров и др., 2011; S. Sakabea et al., 2011). В субъединице HA2 вируса гриппа 2011 года выявлены две замены - E374K и S451N. По мнению Kao et al., вирус, содержащий адаптивную мутацию E374K, вызвал пик заболеваемости гриппом в 2009-2010 годах (Kao et al., 2012). Данная замена (E374K) обнаружена нами у штамма *KSH-2011*, что, по-видимому, свидетельствует о закреплении мутации в геноме вируса гриппа A(H1N1)pdm09, циркулирующем в постпандемический период. На основании классификации генотипов, предложенных в докладе СЦ ВОЗ по изучению вирусов гриппа в Лондоне, был проведен филогенетический анализ исследуемых изолятов (McCauley et al., 2012). Нами определено, что штамм *N13-2009* генетически близок вирусам, циркулировавшим на территории Украины и Гонконга, при этом все эти вирусы не выделяются в отдельную генетическую кладу и остаются наиболее близкими к штамму *A/California/07/2009*, а штамм *KSH-2011*

принадлежит к седьмой генетической кладе, к которой также относятся пандемические вирусы, циркулировавшие в мире в 2011-2012 годах.

Анализ сывороток крови инфицированных мышей показал, что штамм 2009 г. значительно более иммуногенен по сравнению со штаммом 2011 г. Эти данные были подтверждены тестированием иммуногенных свойств штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в 2010-2011 гг. от пациентов из Новосибирской области с подтверждённым диагнозом "грипп" (Курская и др., 2011; Сулопаров и др., 2011; Прокопьева и др., 2013).

Таким образом, для вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на примере штамма *KSH-2011*, выделенного в постпандемический период в 2011 г., отмечено накопление аминокислотных замен в гене гемагглютинаина по сравнению с вирусом гриппа, циркулировавшим в пандемический период 2009 года, что, по-видимому, свидетельствует о непрерывном антигеном дрейфе в вирусной популяции, которая приводит к смене генетических клад. Кроме того, накопление мутаций в генотипе пандемического вируса гриппа 2011 г. привело к снижению его эпидемической активности и патогенности.

С целью изучения патоморфологических изменений в мозговых структурах мышей, под воздействием штамма *KSH-2011*, циркулировавшего в постпандемический период 2011 года, в сравнении с изменениями, возникающими под влиянием штамма *N13-2009*, циркулировавшего в пандемический период 2009 года, было проведено инфицирование мышей линии BALB/c. Нами показано, что у всех экспериментальных мышей развивалось нейротрофическое повреждение головного мозга, которое проявлялось периваскулярным отёком, петехиями, клеточными некрозами нейронов и глиоцитов. Отмечалось, что патологические процессы имели более глубокий характер поражения в случае инфицирования штаммом *N13-2009*, максимальное развитие которых приходилось на десятые сутки после заражения (Прокопьева и др., 2013). Таким образом, достоверно показано, что пандемический ВГ A(H1N1)pdm09 оказывает цитопатическое действие на паренхиматозные и

стромальные клеточные структуры головного мозга, вызывая их дистрофию и некроз.

Представляло интерес сравнить биологические свойства двух субтипов ВГ - высокопатогенного А/Н5N1 и полученного нами адаптированного пандемического варианта А(Н1N1)рdm09 - по летальности в острый период и по характеру структурных изменений в ткани лёгких инфицированных мышей линии BALB/c, а также выявление особенностей развития гриппозного заболевания данных двух высоковирулентных патогенов в сравнении с неадаптированным вариантом пандемического ВГ А(Н1N1)рdm09. В качестве штаммов сравнения нами были выбраны высокопатогенный ВГ А/Н5N1 (штамм *Krasn/05*), адаптированный вариант пандемического ВГ А(Н1N1)рdm09 (штамм *MA-BALB/c*) и неадаптированный вариант пандемического ВГ А(Н1N1)рdm09 (штамм *Tomsk/2010*).

В ходе эксперимента было показано, что высокопатогенный ВГ А/Н5N1 способен вызывать тяжёлую гриппозную инфекцию у экспериментальных мышей линии BALB/c без предварительной адаптации, в то время как пандемический ВГ А(Н1N1)рdm09 без предварительной адаптации не является летальным и не вызывает гибели инфицированных животных. Только под воздействием двух летальных штаммов - *Krasn/05* и *MA-BALB/c* - регистрируется репликация ВГ в головном мозге, печени, почке.

Структурные изменения в лёгких выявляли уже на *первые* сутки после инфицирования в виде кровенаполнения мелких сосудов и повышенной секреторной активности бокаловидных клеток. В случае заражения вирусом А(Н1N1)рdm09 (неадаптированный и адаптированный варианты) степень секреторной активности была значительно выше, чем в случае инфицирования ВПВП А/Н5N1. Вероятно, это связано с высоким титром штамма *Tomsk/2010* и штамма *MA-BALB/c* на начальном этапе воспаления в лёгких, а также с тропностью пандемического ВГ А(Н1N1)рdm09 именно к респираторному эпителию бронхов (Shinya et al., 2006; van Riel et al., 2006). Основные

ультраструктурные изменения в лёгком сводились к следующему: в просвете альвеолярных мешков видны сферические вирусные частицы, клеточные остатки; в цитоплазме альвеолоцитов 1-го типа и макрофагах наблюдали вирусные частицы сферической и нитевидной формы, вироплазму; в альвеолоцитах 2-го типа разрушены гранулы с сурфактантом, много миелиноподобных фигур. На *третьи* сутки в лёгких мышей трёх экспериментальных групп процесс деструкции тканевых структур усугублялся, наблюдалось утолщение эластических мембран, кровоизлияния в строму. Значительно страдали альвеолоциты 2-го типа, в которых регистрировали вироплазму, электронноплотные миелиноподобные структуры. К *шестым* суткам после инфицирования у всех животных отмечали явления микротромбозов, сладж и гемолиз эритроцитов, что, возможно, сопряжено с повреждающим фактором ВГ эндотелия сосудов лёгких (Шестопалова и др. 2011). Однако степень поражения лёгких была наиболее выражена под воздействием летальных штаммов (*Krasn/05* и *MA-BALB/c*). Регистрировали множественные очаги некрозов, увеличение количества фиброзных структур. Картины отшнуровки вируса у животных, инфицированных ВГ А/Н5N1 и адаптированным вариантом ВГ А(Н1N1)pdm09, отмечались чаще, чем в группе животных, инфицированных неадаптированным вариантом ВГ А(Н1N1)pdm09. На *десятые* сутки постинфекционного заражения лёгочный рисунок в обеих группах изменялся за счёт многоочаговых крупных фокусов воспаления. При этом под воздействием штамма *Krasn/05* и штамма *MA-BALB/c* отмечали развитие интерстициальной пневмонии, а под воздействием штамма *Tomsk/2010* – воспалительный процесс был, преимущественно, выражен бронхитом с локальными участками воспаления интерстиция.

ВЫВОДЫ

1. Пандемический ВГ A(H1N1)pdm09 способен быстро адаптироваться к генетически различным лабораторным мышам, вызывая 100% летальность благодаря селекционному накоплению аминокислотных замен в геноме. Полученный адаптированный вариант вызывает в организме инфицированных животных генерализованную инфекцию аналогично ВГ A/H5N1. Высоковирулентные свойства адаптированных штаммов отличаются при перекрёстном инфицировании различных генетических линиях лабораторных мышей.
2. Получены три высоковирулентных адаптированных варианта пандемического ВГ A(H1N1)pdm09 к генетически различным мышам:
 - *MA-BALB/c* - к мышам инбредной линии BALB/c;
 - *MA-C57BL/6z* - к мышам инбредной линии C57BL/6z;
 - *MA-CD1* - к аутбредным мышам CD1.
3. Анализ первичной структуры всех белков пандемического ВГ неадаптированного варианта (штамм *Tomsk/2010*) и адаптированных вариантов (штамм *MA-BALB/c*, *MA-C57BL/6z* и *MA-CD1*) выявил 19 аминокислотных замен в шести белках (НА, NA, NP, NS2, PB2, PB1) и наличие потенциальной экспрессии факультативного неструктурного белка PB1-F2 у адаптированных вариантов вируса. Наиболее генетически близкими являются штамм *MA-BALB/c* и штамм *MA-C57BL/6z*.
4. Обнаружен ряд одинаковых аминокислотных замен, которые, вероятно, отвечают за усиление патогенности штаммов *MA-BALB/c*, *MA-C57BL/6z* и *MA-CD1* во время адаптации к экспериментальным животным: в белке PB2 (S317L; T271A; R482K; T689A; I690V), в белке PA (295P), в белке НА (E172G, G239D), в белке NP(N375D), в белке NA (I357V; L443I; T467I), в белке NS2 (M235V, A236V).

5. Неадаптированный вариант пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *Tomsk/2010*) реплицируется только в лёгких и не является летальным для экспериментально заражённых мышей, в то время как адаптированный вариант пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *MA-BALB/c*) и высокопатогенный ВГ А/Н5N1 (штамм *Krasn/05*) являются летальными для мышей линии BALB/c, под воздействием которых регистрируется репликация вируса в лёгких, головном мозге, печени и почке.
6. Исследование лёгких мышей линии BALB/c выявило развитие интерстициальной пневмонии к 6^{ым} суткам после инфицирования адаптированным вариантом пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *MA-BALB/c*) с преимущественной репродукцией вируса в альвеолоцитах 2-го типа и в альвеолярных макрофагах.
7. Исследование головного мозга, печени и почек мышей линии BALB/c выявило персистенцию адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *MA-BALB/c*) на 3^и сутки после инфицирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненных работ получены адаптированные варианты ВГ А(Н1N1)pdm09, которые представляют собой панель пандемических штаммов вируса гриппа А/Tomsk/273-MA1/2010(H1N1pdm09), А/Tomsk/273-MA2/2010(H1N1pdm09) и А/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09), адаптированных к мышам инбредных линий BALB/c, C57BL/6z и к аутбредным мышам CD1, соответственно. Полученная панель может быть использована для изучения механизмов адаптации вирусных патогенов к новым хозяевам с оценкой действия противовирусных химиопрепаратов. Благодаря выполненному анализу полных геномов адаптированных вариантов ВГ А(Н1N1)pdm09 и развернутому обзору литературы создана база данных маркеров патогенности, которая может найти своё применение для тестирования и разработки лекарственных препаратов, основным механизмом действия которых может быть блокировка проникновения вируса в клетку или нарушение работы полимеразного комплекса ВГ.

Проведено изучение патогенеза гриппозной инфекции с помощью различных методов анализа (вирусологический, молекулярно-биологический, световой, иммуногистохимический и электронно-микроскопический). Полученные данные легли в основу публикаций в ведущих российских и международных журналах и были представлены на российских и международных конференциях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ARDS (acute respiratory distress syndrome) - ОРДС (острый респираторный дистресс-синдром)
- DNA (deoxyribonucleic acid) – ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота)
- FLUAV (*influenza A virus*) – ВГА (вирус гриппа А)
- FLUBV (*influenza B virus*) – вирус гриппа В
- FLUCV (*influenza C virus*) – вирус гриппа С
- HA (hemagglutinin) – ГА (гемагглютинин)
- HPAIV (*highly pathogenic avian influenza viruses*) – ВПВГП (высокопатогенный вирус гриппа птиц)
- IVPI (Intra venous pathogenicity index) – индекс патогенности при внутривенном введении
- LPAIV (low pathogenic avian influenza viruses) – НПВГП (низкопатогенный вирус гриппа птиц)
- LD₅₀ (50% lethal dose) - доза вируса, убивающая 50% инфицированных лабораторных животных
- MDCK (Madin-Darby canine kidney) – культура клеток почки собаки
- M1 (matrix protein) – матричный белок
- M2 (membrane protein) – мембранный белок
- MID₅₀ (50% mouse infectious dose) - доза вируса, инфицирующая 50% экспериментальных животных
- mRNA (maternal RNA) – мРНК (матричная РНК)
- NA (neuraminidase) – нейраминидаза
- NP (nucleocapsid protein) – нуклеокапсидный белок
- NS – неструктурный белок
- PA – полимеразный белок
- PB1 – полимеразный белок 1
- PB2 – полимеразный белок 2
- PBS (phosphate buffered saline) – фосфатно-солевой буфер (ФСБ)
- PFU (plaque forming units) - БОЕ (бляшкообразующая единица).
- RBD (Receptor-Binding Domain) - РСС (рецептор-связывающий сайт)
- RdRp (RNA-dependent RNA-polymerase) - РНК-зависимая РНК-полимераза
- RNA (Ribonucleic acid) – РНК (рибонуклеиновая кислота)
- RNP (Ribonucleoprotein) – РНП (рибонуклеопротеидный комплекс)
- ssRNA (single-stranded RNA) – однонитчатая РНК
- TCID₅₀ (tissue culture infectious dose) – инфекционная доза, заражающая 50% культуры клеток
- vRNA (virus RNA) – вРНК (вирусная РНК)
- А.ж. – аллантоисная жидкость
- А.к. – аминокислота
- БОЕ – бляшкообразующая единица
- ВГ – вирус гриппа

ВГП – вирус гриппа птиц
ВГА – вирус гриппа А типа
ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
ВП – вирусная пневмония
ВПВГП – высокопатогенный вирус гриппа птиц
ВСЖ – вируссодержащая жидкость
ГАЕ – гемагглютинирующая единица
ГЛБ – гематоликворный барьер
ДВС синдром – синдром диссеминированного внутрисосудистого свёртывания
кРНК – РНК, комплементарная геномной РНК
1 ЛД₅₀ – доза вируса, убивающая 50% инфицированных лабораторных животных
МИД₅₀ – доза вируса, инфицирующая 50% экспериментальных животных
МН – реакция микронеutralизации
НПВГП – низкопатогенный вирус гриппа птиц
ОТ – обратная транскрипция
ОРДС - острый респираторный дистресс-синдром
П.н. – пара нуклеотидов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РГА – реакция гемагглютинации
РКЭ – развивающийся куриный эмбрион
РСС – рецептор-связывающий сайт
РТГА – реакция торможения гемагглютинации
САЖ – стабилизирующий раствор, содержащий 10% сахарозы и 15% желатина
ТЦД – тканевая цитопатическая доза
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЦНС – центральная нервная система
ЦПЭ – цитопатический эффект
1 ЭИД₅₀ – эмбриональная инфекционная доза вируса, инфицирующая 50% куриных эмбрионов

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Полученные в ходе данной работы адаптированные варианты пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 могут быть использованы в общей и медицинской вирусологии для моделирования летальной гриппозной инфекции с целью изучения биологических свойств пандемического ВГ, а также эффективности лечебных и профилактических препаратов против пандемического ВГ в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Три адаптированных варианта пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 обладают уникальными антигенными и молекулярно-биологическими свойствами, отличными от таковых для вируса сезонного гриппа субтипа А/Н1N1.

Изобретение "Панель пандемических штаммов вируса гриппа А/Tomsk/273-МА1/2010(Н1N1pdm09), А/Tomsk/273-МА2/2010(Н1N1pdm09) и А/Tomsk/273-МА3/2010(Н1N1pdm09) для изучения механизмов адаптации вирусных патогенов к новым хозяевам с оценкой действия противовирусных химиопрепаратов" относится к разделам эпизоотологии, эпидемиологии, общей и медицинской вирусологии и касается вируса гриппа А. Данное изобретение создает адекватные модели изучения активности противовирусных препаратов против пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 *in vitro* и *in vivo*. Три адаптированных варианта пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 обладают уникальными антигенными и молекулярно-биологическими свойствами, отличными от таковых для вируса сезонного гриппа субтипа А/Н1N1 (номер заявки на патент 2015108981 от 13.03.2015 (приложение № 3). Кроме того, получен патент "Синтетические олигонуклеотиды-праймеры, используемые для получения первичных последовательностей генов (PB2, PB1, PA, NP, MP, NS) низкопатогенных вирусов гриппа птиц", который относится к биотехнологии, молекулярной биологии, и может быть использован в диагностических целях идентификации вируса гриппа птиц в вирусологии и ветеринарии, а также для решения научно-исследовательских задач по изучению данного вируса (приложение № 4).

Полученный в результате адаптации к аутобрезным мышам CD1 штамм *MA-CD1* использовали в лаборатории экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний и лабораторией структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний в рамках выполнения основной темы НИР "Исследование молекулярно-клеточных основ патогенеза новых и наиболее распространенных на территории Сибири инфекционных заболеваний вирусной этиологии для разработки средств их специфической профилактики" номер государственной регистрации 0121353865. Кроме того, штамм *MA-CD1* использовали в доклиническом исследовании специфической активности окисленных декстранов "Исследование профилактической эффективности окисленных декстранов с молекулярной массой 40 кДа (декстраналь 40, диальдегид декстран 40, ОД - 40) и 70 кДа (декстраналь 70, диальдегид декстран 70, ОД - 70) при интраназальном введении на модели гриппа у мышей" (приложение № 5).

Полученные результаты могут быть использованы широким кругом ветеринарных и медицинских специалистов, студентами ВУЗов, а также специалистами другого профиля, принимающих участие в организации и проведении противоэпизоотических и противоэпидемических мероприятий при гриппе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеев, С.Н. Тяжелые формы пандемического гриппа А/Н1N1 2009 / С.Н. Авдеев // Атмосфера. Пульмология и аллергология. – 2010. - № 4. – С. 2-10.
2. Автандилов, Г.Г. Основы количественной патологической анатомии: Учебное пособие. – М.: Медицина, 2002. - 240 с.
3. Агафонов, А.П. Изучение свойств пандемического вируса гриппа А(Н1N1), циркулировавшего на территории РФ в 2009-2010 гг. / А.П. Агафонов, А.М. Шестопалов, А.Н. Шиков [и др.]. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2011. - № 4. - С. 24-27.
4. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. - М.: Медгиз, 1962. - 179 с.
5. Вирус гриппа А/Н5N1: атлас патологических изменений внутренних органов домашней птицы / под ред. акад. РАМН, д.м.н., проф. Г.Г. Онищенко, д.м.н., проф. И.Г. Дроздова – Новосибирск: Информ-Экспресс, 2009 – 240 с.
6. ВОЗ, 2005. Еженедельный эпидемиологический бюллетень (Weekly epidemiological record), № 33, http://www.who.int/immunization/influenza_Russian.pdf
7. ВОЗ, 2005. Птичий грипп: оценка угрозы пандемии. http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_2005.29_rus.pdf
8. ВОЗ, 2006. Вопросы и ответы о гриппе http://www.who.int/foodsafety/micro/AI_QandA_May06_RU.pdf
9. ВОЗ, 2009 (а). М. Чен. Мир в начале пандемии гриппа 2009 года. http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase_6_20090611/ru/
10. ВОЗ, 2009 (б). Часто задаваемые вопросы о гриппе А (Н1N1) <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/faq/ru>

11. ВОЗ, 2011. Бюллетень ВОЗ от 22.06.2011. – URL: <http://>
12. Гендон, Ю.З. Пандемия гриппа: факты и предложения / Ю.З. Гендон // Педиатрическая фармакология. – 2008. – Т. 5 - № 8. – С. 14-19.
13. Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика / Под ред. акад. РАМН проф. О.И. Киселева, д-ра мед. наук. Л.М. Цыбаловой, акад. РАМН проф. В.И. Покровского. М.: ООО Изд-во «Медицинское информационное агентство», 2012. – 496 с.
14. Громашевский, Л.В. Механизм передачи инфекции. - Киев: Гос. мед. изд-во УССР, 1962.- 446 с.
15. Карпова, Л.С., Бурцева Е.И., Поповцева Н.М., Столярова Т.П. Эпидемиология гриппа А(Н1N1) Калифорния/07/09 среди населения 49 городов России в сезон 2009–2010 гг. / Л.С. Карпова, Е.И. Бурцева, Н.М. Поповцева, Т.П. Столярова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2011. Т. 5. С. 6-15.
16. Карпухин, Г.И. Грипп. Руководство для врачей / Г.И. Карпухин. - СПб.: Гиппократ, 2001.- 360 с.
17. Карпухин, Г.И. Диагностика, профилактика и лечение острых респираторных заболеваний / Г.И. Карпухин, О.Г. Карпухина. - СПб.: Гиппократ, 2000. - 184 с.
18. Киселев, О.И. Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1-2009 / О.И. Киселев– М.: Изд-во «Дмитрейд График Групп», 2011. – 164 с.
19. Киселев, О.И. Геном пандемического гриппа А/Н1N1v-2009/10 вируса. СПб.; М., 2011. - 164 с.
20. Киселёв, О.И. Изоляты вируса гриппа подтипа Н5N1, выделенные от домашней птицы в Курганской области в 2005 году: молекулярно-генетическая характеристика / О.И. Киселёв, В.М. Блинов, М.М. Писарева [и др.] // Молекулярная биология. – 2008. -№ 1(42). – С. 78-87.
21. Киселёв, О.И. На пути предсказательного конструирования пандемических вирусов гриппа типа А / О.И. Киселёв, Д.К. Львов //

- Вопросы вирусологии. – 2012. – Приложение 1: Специальный выпуск, посвященный 120-й годовщине со дня открытия вирусов русским ученым Д.И. Ивановским. – С. 137-147.
22. Киселёв, О.И. Прогресс в создании пандемических противогриппозных вакцин и технологии их производства / О.И. Киселев // Биотехнология.- 2010. - № 2. - С.8-24.
23. Колобухина, Л.В. Пандемический грипп в России: отличительные особенности клинического течения и отсутствие ранней этиотропной терапии как фактор риска развития тяжелых форм заболевания / Л.В. Колобухина, Л.Н. Меркулова, М.Ю. Щелканов [и др.] // Терапевтический архив. – 2011. - №9. – С. 48-53.
24. Крылов, П.С. Аминокислотные замены в гемагглютинине вируса гриппа подтипа H5, влияющие на антигенную специфичность и вирулентность вируса / П.С. Крылов, Е.А. Говоркова, Н.В. Каверин // Вопросы вирусологии. – 2009. – Т.54. - №5. – С. 14-19.
25. Кузнецов, О. К. Механизмы возможного появления пандемического вируса гриппа // О.К. Кузнецов, Л.А. Степанова. – Биомедицинский журнал (medline.ru.) – 2006. – Т. 7. – С. - 337 - 348
http://www.medline.ru/public/pdf/7_031.pdf
26. Кузнецов, О. К. Пандемия гриппа: основные положения о появлении возбудителя, критическая оценка риска её развития в ближайшие годы / О. К. Кузнецов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика - 2007. - № 4. - С. 10-13.
27. Курская, О. Г. Изучение пандемического гриппа А/Н1N1 в Сибирском и Дальневосточном регионах (сезон 2009-2010) / О. Г. Курская, И. М. Сулопаров, А.Г. Дурыманов [и др.] // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. - 2011. - Т. 9. - № 3. - С. 13-19.

28. Лукьянов, С. А. Прогностическое значение некоторых показателей в многофакторной регрессионной модели при вирусных пневмониях во время пандемии гриппа типа А(Н1N1) / С.А. Лукьянов, В.В. Горбунов, А.В. Говорин, Е.Н. Романова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН – 2010. - №3(73). – С. 104-108.
29. Львов, Д.К. Вирусы гриппа: события и прогнозы / Д.К.Львов, А.Д.Забережный, Т.И.Алипер // Природа. – 2006. - № 6(1090). – С. 3-13.
30. Львов, Д.К. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ № 2452 от 24.05.2009) первого штамма А/IV*-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, подобно свиному вирусу А(Н1N1) от первого выявленного 24.05.2009 больного в Москве / Д.К. Львов., Е.И. Бурцева, А.Г. Прилипов [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2009. - № 5. - С. 10-14.
31. Львов, Д.К. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ № 2452 от 24.05.2009)sw1, подобного свиному вирусу А(Н1N1) от первого выявленного 21.05.2009 больного в Москве / Д.К. Львов, Е.И. Бурцева, А.Г. Прилипов // Вопросы вирусологии. - 2009. - № 5(4). - С. 10-14.
32. Львов, Д.К. Межпопуляционное взаимодействие в системе вируса гриппа А – «животные – человек» / Д.К. Львов, С.С. Ямникова, А.Д. Забережный, Т.В. Гребенщикова // Вопросы вирусологии. - 2005. - № 4. С. 4-11.
33. Львов, Д.К. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и аспарагин в рецепторсвязывающем сайте гемагглютинина в вариантах пандемического вируса гриппа А/Н1N1 от больных с летальным исходом и со среднетяжелой формой заболевания / Д.К. Львов, К.Б. Яшкулов, А.Г. Прилипов и др. // Вопросы вирусологии. – 2010. – Т.55. - №3. – С.15-18.
34. Львов, Д.К. Персистенция генов эпидемических вирусов в природных популяциях / Львов Д.К., Жданов В.М. // Вопросы вирусологии. 1982. - № 4. – С. 17 -20.

35. Львов, Д.К. Экология и эволюция вирусов гриппа в России (1979 - 2002 гг.) / Д.К. Львов, А.И. Ковтунов, К.Б. Яшкулов [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2004. – Т.49. - № 3. – С. 17 - 25.
36. Любовцева, О.В. Методические рекомендации по применению современных исследований в общей и медицинской вирусологии / О.В. Любовцева, Л.Я. Закстельская – М., 1984. – С. 52-57.
37. Малый, В.П. Грипп. Пособие для врачей / В.П. Малый, М.Г. Романцов, Т.В. Сологуб. – СПб.; Харьков.: «Тактик–студио», 2007. – 108 с.
38. Маринина, В.П. Влияние утраты сайтов гликозилирования, расположенных вблизи рецептор-связывающего участка, на рецепторный фенотип H1N1 вируса гриппа человека / В.П. Маринина, А.С. Гамбарян, Н.В. Бовин [и др.] // Молекулярная биология. – 2003. – Т. 37. - № 3. – С. 550-555.
39. Науменко, В.Г. Гистологический и цитологический методы исследования в судебной медицине / В.Г. Науменко, Н.А. Митяева - М., 1980. – 303 с.
40. Науменко, В.Г. Гистологический и цитологический методы исследования в судебной медицине / В.Г. Науменко, Н.А. Митяева - М. “Медицина”. - 1980. - 311 с.
41. Онищенко, Г.Г. Грипп птиц в Сибири - 2005: Лабораторные и эпидемиологические исследования, противоэпидемические и противоэпизоотические мероприятия в период эпизоотии вируса гриппа среди домашней птицы в Сибирском и Уральском федеральных округах Российской Федерации (июль – ноябрь 2005 года) / Г.Г. Онищенко, Г.Ф. Лазикова, Е.Ф. Ежлова [и др.]. – Новосибирск: Изд-во «Цэрис», 2006. – 192 с.
42. Паньков, А.С. Особенности микрофлоры при гриппе и ОРЗ / А.С. Паньков // Известия Оренбургского аграрного университета. - 2011. - № 3. - С. 313-314.

43. Прокопьева, Е.А. Биологические свойства вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, циркулировавшего в Западной Сибири в пандемический и постпандемический периоды / Е.А. Прокопьева, О.Г. Курская, С.Г. Сайфутдинова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. - Т. 156. - № 11. - С. 620-627.
44. Прокопьева, Е.А. Ультраструктурное исследование особенностей топологии пандемического вируса гриппа Н1N1 и высокопатогенного вируса гриппа птиц Н5N1 в клетках легких и головного мозга / Е.А. Прокопьева, К.В. Корчагина, Л.В. Шестопалова [и др.] // Казанская наука. - 2010. - Вып. 8. - С. 50–54.
45. Романовская, А.А. Пандемический вирус гриппа А (Н1N1) в Амурской области осенью 2009г. / А.А. Романовская, Т.Н. Ильичева, А.Г. Дурыманов [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2011. - № 1. - С. 35-39.
46. Руководство по ветеринарной вирусологии / под ред. В. Н. Сюрица - М., 1966 – 687 с.
47. Сайфутдинова, С.Г. Экология вируса гриппа у чаек Дальнего Востока России / С.Г. Сайфутдинова, К.А. Шаршов, Ю.Н. Герасимов [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. - 2012. - № 5-1 (87). - С. 316-318.
48. Сергеев, В.А. Репродукция и выращивание вирусов животных / В.А. Сергеев - М., 1976 – 303 с.
49. Серов, В.В. Ультраструктурная патология / В.В. Серов, В.С. Пауков - М. "Медицина", 1975. - 432 с.
50. Синопальников, А. И. Диагностика, профилактика и лечение гриппа. / А.И. Синопальников, Ю.Г. Белоцерковская // 2006. – Клиницист. - № 1. – С. 23-33.
51. Смирнов, В.С. Профилактика и лечение гриппа и острых респираторных вирусных инфекций / В.С. Смирнов – СПб: АЙСИНГ, 2012. – 56 с.

52. Смородинцев, А. А. Гипотезы и факты о происхождении пандемических штаммов вирусов гриппа А / А.А. Смородинцев // Вопросы вирусологии. – 1975. - № 1. – С. 105-113
53. Смородинцев, А.А. Грипп и его профилактика / А.А. Смородинцев - М.: Медицина; 1984.
54. Сулима, Д. Л. Гипертоксический грипп / Д.Л. Сулима, Е.В. Карев, К.В. Жданов // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2. - № 1. – С. – 75–79.
55. Сулопаров, И. М. Генетическая характеристика штамма вируса гриппа А (H1N1), вызвавшего пандемию в 2009г. / И.М. Сулопаров, К.А.Шаршов, А.А. Романовская [и др.] // Иммунобиология. - 2011. - №5. - С. 107–110.
56. Сюрин В.Н. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина // М.:ВНИТИБП, 1998. - 928 с.
57. Усович, А.Т. Применение математической статистики при обработке экспериментальных данных в ветеринарии / А.Т. Усович, П.Т. Лебедев – Западно-Сибирское книжное изд. Омское отделение, 1970 – 45 с.
58. Цинзерлинг, В. А. Патогенетические аспекты гриппа в период эпидемии, вызванной вирусом гриппа А/H1N1v в 2009–2010 гг. по аутопсии / В.А. Цинзерлинг, С.Л. Воробьев, В.В. Зарубаев [и др.] // Архив патологии. - 2011. - Т. 73. № 6. С. 21–29.
59. Шаршов, К.А. Экология и эволюция высокопатогенного вируса гриппа H5N1 в России (2005-2012 гг.) / К.А. Шаршов, В.Ю. Марченко, А.К. Юрлов, Л.М. Шестопапов // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. - 2012. - № 5-1 (87). - С. 393-396.
60. Шестопапова, Л. В. Ультраструктурные изменения альвеолоцитов и макрофагов лёгких под влиянием высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1 / Л.В. Шестопапова, Е.А. Прокопьева, К.В. Корчагина [и др.] // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. - 2011. - Т. 9. - № 1. - С. 58-65.

61. Щелканов, М.Ю. Генотипическая структура рода Influenza A virus / М.Ю. Щелканов, Д.К. Львов // Вестник РАМН. – 2011. – № 5. – С. 19–23.
62. Щелканов, М.Ю. Таксономическая структура Orthomyxoviridae: современное состояние и ближайшие перспективы // М.Ю. Щелканов, И.Т. Федякина, Е.С. Прошина [и др.] / Вестник российской академии медицинских наук. - 2011. – Т. 5. – С. 12-19.
63. Alberts, R. Gene expression changes in the host response between resistant and susceptible inbred mouse strains after influenza A infection / R. Alberts, B. Srivastava, H. Wu et al. // Microbes and infection. Institut Pasteur. – 2010. - № 12. – P. 309–318.
64. Ali, M.J. Transmissibility of influenza viruses in hamsters / M.J. Ali, C.Z. Teh, R. Jennings, C.W.Potter // Archives of virology. - 1982. - № 72. – P. 187–197.
65. Amonsin, A. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand / A. Amonsin, S. Payungporn, A. Theamboonlers et al. // Virology. – 2006. - № 344(2). – P. 480-491.
66. Arias, C.F. Molecular Anatomy of 2009 Influenza Virus A (H1N1) / C.F. Arias, M. Escalera-Zamudio, L. Soto-Del Río Mde et al. // Archives of medical research. - 2009. - № 40. - P. 643-654.
67. Avian Influenza Virus / Erica Spackman - Southeast Poultry Research Laboratory, US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Athens, GA, 2008 – 141 p.
68. Baldanti, F. Severe outcome of influenza A/H1N1/09v infection associated with 222GN polymorphisms in the haemagglutinin: a multicentre study / F. Baldanti, G. Campanini, A. Piralla et al. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. - 2011. - №17. - P.1166–1169.
69. Barker, W.H. Pneumonia and influenza deaths during epidemics: implications for prevention // W.H. Barker, J.P. Mullooly. - 1982. - Archives of internal medicine. – № 142(1). – P.85–89.

70. Barnett, J.M. In vitro selection and characterisation of influenza B/Beijing/1/87 isolates with altered susceptibility to zanamivir / J.M. Barnett A. Cadman, F.M. Burrell et al. // *Virology*. - 1999. - № 265. - P. 286-295.
71. Baz, M. Characterization of drug resistant recombinant influenza A/H1N1 viruses selected in vitro with peramivir and zanamivir / M. Baz, Y. Abed, G. Boivin // *Antiviral research*. - 2007. - №74. - P. 159-162.
72. Bean, B. Survival of influenza viruses on environmental surfaces / B. Bean, B.M. Moore, B. Sterner et al. // *The Journal of infectious diseases*. - 1982. - № 146(1). - P. 47–51.
73. Belser, J.A. Use of animal models to understand the pandemic potential of highly pathogenic avian influenza viruses / J.A. Belser, K.J. Szretter, J.M. Katz, T.M. Tumpey // *Advances in virus research*. - 2009. - № 73. - P. 55-97. doi: 10.1016/S0065-3527(09)73002-7.
74. Bodewes, R. Recurring influenza B virus infections in seals / R. Bodewes, D. Morick, G. de Mutsert et al. // *Emerging infectious diseases*. – 2013. - № 19(3). - P. 511-2.
75. Bouvier, N.M. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission / N. M. Bouvier, A. C. Lowen // *Viruses*. – 2010. - № 2(8). – 1530-1563.
76. Brookes, S.M. Replication, pathogenesis and transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus in non-immune pigs / S.M. Brookes, A. Núñez, B. Choudhury et al. // *PLoS One*. – 2010. - № 5(2):e9068. doi: 10.1371/journal.pone.0009068.
77. Brown, I.H. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype / I.H. Brown, P.A. Harris, J.W. McCauley, D.J. Alexander // *The Journal of general virology*. - 1998. - V. 79. – P. 2947-2955.
78. CDC, 2009. Novel Influenza A (H1N1) Virus Infections in Three Pregnant Women - United States, April-May 2009. Centers for Disease Control and

- Prevention (US) // MMWR. Morbidity and mortality weekly report. 2009: 58 (18). P. 497 - 500. Situation Update, 8 January 2014.
79. CDC, 2009. Update: novel influenza A (H1N1) virus infections - worldwide, May 6, 2009 / Centers for Disease Control and Prevention (US) // MMWR. Morbidity and mortality weekly report. Situation Update, 8 January 2014. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5817a1.htm>
80. Chan, P.K. Clinical and virological course of infection with haemagglutinin D222G mutant strain of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus / P.K. Chan N. Lee, G.M. Joynt et al. // Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. - 2011. - №50. - P.320–324.
81. Chang, K. Wild Type and Mutant 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Viruses Cause More Severe Disease and Higher Mortality in Pregnant BALB/c Mice / K. Chan, A.J. Zhang, K.K. To et al. // PLoS ONE. - 2010. - V.5 - I.10 - e13757.
82. Chaves, A.J. Neuropathogenesis of a highly pathogenic avian influenza virus (H7N1) in experimentally infected chickens / A.J. Chaves, N. Busquets, R. Valle et al. // Veterinary research. - 2011. - V. 42. - № 1. - P. 106–111.
83. Chen, Y. Dogs are highly susceptible to H5N1 avian influenza virus / Y. Chen, G. Zhong, G. Wang et al. // Virology. - 2010. - V. 405. - № 1. - P. 15-19.
84. Chowell, G. Severe Respiratory Disease Concurrent with the Circulation of H1N1 Influenza / G. Chowell, S.M. Bertozzi, A. Colchero // The New England Journal Of Medicine. – 2009. – V. 361. – P. 674–683.
85. Chu, C.M. Filamentous forms associated with newly isolated influenza virus / C.M. Chu, I.M. Dawson, W.J. Elford. - 1949. - Lancet **i**:602.
86. Cioc, A.M. Histologic and in situ viral findings in the myocardium in cases of sudden, unexpected death / A.M. Cioc, G.J. Nuovo // Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.- 2001. - № 15. – P. 914–922.

87. Conenello, G.M. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence / G.M. Conenello, D. Zamarin, L.A. Perrone et al. // *PLoS Pathogen.* - 2007. - № 3. P. 1414-1421.
88. Connor, R.G. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates / R.G. Connor, Y. Kawaoka, R.G. Webster, J.C. Paulson // *Virology.* - 1994. – № 205(1) – P. 17-23.
89. Cox, N.J. Global epidemiology of influenza: past and present / N.J. Cox, K. Subbarao // *Annual review of medicine.* - 2000. - № 51. — P. 407-421.
90. Cox, N.J. Influenza / N.J. Cox, K. Subbarao // *Lancet.* - 1999. - № 354(9186). - P. 1277-1282.
91. Creighton, C. Influenza. In: Creighton C, editor. A history of epidemics in Great Britain from AD 664 to the extinction of plague. University Press; Cambridge: 1891. pp. 397–413. Цитировано по J.K. Taubenberger and D.M. Morens, 2009.
92. Creighton, C. Influenza. In: Creighton C, editor. A history of epidemics in Great Britain from AD 664 to the extinction of plague // University Press. Cambridge. - 1891. - pp. 397–413. Цитировано по J.K. Taubenberger and D.M. Morens, 2009.
93. Crescenzo-Chaigne, B. Differential effect of nucleotide substitutions in the 3' arm of the influenza A virus vRNA promoter on transcription / replication by avian and human polymerase complexes is related to the nature of PB2 amino acid 627 / B. Crescenzo-Chaigne, S. van der Werf, N. Naffakh // *Virology.* - 2002. - № 303(2). – P. 240–252.
94. Crosby, A. America's Forgotten Pandemic. 2. New York: Cambridge University Press; 2003.
95. Dacso, C.C. Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections / C.C. Dacso, R.B. Couch, H.R. Six et al. // *Journal of clinical microbiology.* - 1984. - № 20(4). — P. 833-835.

96. Dawood, F.S. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study / F.S. Dawood, A.D. Iuliano, C. Reed et al. // *Lancet Infection Disease*. - 2012. - № 12(9). - P. 687 – 695.
97. de Jong, M.D. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia / M.D. de Jong, C.P. Simmons, T.T. Thanh et al // *Nature medicine*. – 2006. - № 12. – P. 1203-1207.
98. de Vries, A. Neuraminidase H275Y and hemagglutinin D222G mutations in a fatal case of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection / A. de Vries, J. Wotton, C. Lees et al. // *Influenza and other respiratory viruses*. - 2012. - V. 6. - № 6. - E. 85-88.
99. Delogu, M. Can Preening Contribute to Influenza A Virus Infection in Wild Waterbirds? / M. Delogu, M.A. De Marco, L. Di Trani et al. // *PLoS One*. 2010. - № 5(6). - e11315.
100. Ducatez, M.F. Both influenza hemagglutinin and polymerase acidic genes are important for delayed pandemic 2009 H1N1 virus clearance in the ferret model / M.F. Ducatez, Ilyushina NA, Fabrizio TP, et al. // *Virology*. - 2012. - V.432. - № 2. - P. 389-93.
101. Easterday, B.C. Influenza / B.C. Easterday, V.S. Hinshaw, D.A. Halvorson // *Diseases of poultry*. - Iowa State University Press. - Ames.- Iowa, 1997.- P. 583-605.
102. Finkler, D. Influenza. In: Stedman TL, editor. Twentieth century practice, infectious diseases // XVI. William Wood and Co; New York. - 1898. - P. 1–249. Цитировано по J.K. Taubenberger and D.M. Morens, 2009.
103. Fukuyama, S. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors / S. Fukuyama, Y. Kawaoka // *Current opinion in immunology*. - 2011. 23(4):481-486. doi: 10.1016/j.coi.2011.07.016.
104. Galigliany, MM. Influenza A strain-dependent pathogenesis in fatal H1N1 and H5N1 subtype infections of mice / MM. Galigliany, A. Habyarimana,

- B. Lambrecht et al. // *Emerging infectious diseases*. – 2010. - № 16(4). – P. 595-603. doi: 10.3201/eid1604.091061.
105. Gao, Y. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host / Y. Gao, Y. Zhang, K. Shinya et al. // *PLoS pathogens*. – 2009. - № 5. - e1000709.
106. Garcia-Sastre, A. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems / A. Garcia-Sastre, A. Egorov, D. Matassov et al. // *Virology*. - 1998. - № 252(2). - P. 324-330.
107. Garigliany, M.M. Influenza A strain-dependent pathogenesis in fatal H1N1 and H5N1 subtype infections of mice / M.M. Garigliany, A. Habyarimana, B. Lambrecht et al. // *Emerging infectious diseases*. – 2010. - № 16(4). – P. 595-603. doi: 10.3201/eid1604.091061.
108. Garten, R.J. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin A(H1N1) influenza viruses circulating in humans / R.J. Garten, C.T. Davis, C.A. Russell et al. // *Science*. - 2009. - V. 325. - P. 197-201.
109. Ghendon, Y. Influenza surveillance / Y. Ghendon // *Bulletin of the World Health Organization*. - 1991. - № 69(5). — P. 509-515.
110. Giria, M.T. Genomic signatures and antiviral drug susceptibility profile of A(H1N1)pdm09 / M.T. Giria, H. Rebelo de Andrade, L.A. Santos et al. // *Journal of clinical virology*. - 2012. - № 53. -P. 140–144.
111. Glaser, L. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity / L. Glaser, J. Stevens, D. Zamarin et al. // *Journal virology*. - 2005. - № 79. - P. 11533-11536.
112. Glaser, L. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity / L. Glaser, J. Stevens, D. Zamarin et al. // *Journal Virology*. - 2005. - № 79(47). - P. 11533-11536.
113. Gubareva, L.V. Characterization of mutants of influenza A virus selected with the neuraminidase inhibitor 4-guanidino-Neu5Ac2en / L.V. Gubareva, R. Bethell, G.J. Hart et al. // *Journal virology*. - 1996. -№ 70. - P. 1818-1827.

114. Gubareva, L.V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors / L.V. Gubareva // *Virus research*. - 2004. - № 103. - P. 199-203.
115. Ha-Lee, Y.M. Mode of spread to and within the central nervous system after oral infection of neonatal mice with the DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus / Y.M. Ha-Lee, K. Dillon, B. Kosaras et al. // *Journal virology*. - 1995. - V.69. - № 11. - P. 7354–7361.
116. Hale, B.G. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein / B.G.Hale, J. Steel, R.A. Medina et al. // *Journal of virology*. - 2010. - № 84(14). - P. 6909-6922.
117. Hancock, K. Serologic Detection of Human Influenza Virus Infections by Hemagglutination-Inhibition Assay Using Turkey RBCs, LP-003, R-1 / K. Hancock // Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA. Effective October 2, 2009.
118. Hatta, M. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice / M. Hatta [et al.] // *PLoS pathogens*. - 2007. - № 3. - P. 1374-1379.
119. Hatta, M. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses // M. Hatta, M.A. De Marco, L. Di Trani et al. // *Science*. - 2001. - № 293. P. 1840-1842.
120. Hause, B.M. Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the orthomyxoviridae family / B.M. Hause, E.A. Collin, R. Liu et al. // *mBio* [electronic resource]. – 2014. - № 5(2). pii: e00031-14. doi: 10.1128/mBio.00031-14.
121. Herfst, S. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets / S. Herfst, E.J. Schrauwen, M. Linster et al. // *Science*. - 2012. - № 336(6088). - P. 1534-1541. doi: 10.1126/science.1213362.

122. Hinshaw, V.S. The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine / V.S. Hinshaw, W.J. Bean, R.G. Webster, B.C. Easterday // *Virology*. - 1978. - № 84(1). - P. 51-62.
123. Horimoto, T. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses/ T. Horimoto, Y. Kawaoka // *Clinical microbiology reviews*. - 2001. - № 14(1). - P. 129-149.
124. Horimoto, T. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses / T. Horimoto, K Nakayama, S.P. Smeeckens, Y. Kawaoka // *Journal virology*. - 1994. - № 68. - P. 6074-6078.
125. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. - 2012. - <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
126. Ilyicheva, T. Influenza A/H1N1pdm virus in Russian Asia in 2009-2010 / T. Ilyicheva, I. Susloparov, A. Durymanov et al. // *Infection, genetics and evolution*. - 2011. - V. 11. - N 8. - P. 2107-2112.
127. Ilyushina, N.A. Adaptation of pandemic H1N1 influenza viruses in mice / N.A. Ilyushina, A.M. Khalenkov, J.P. Seiler et al. // *Journal of virology*. - 2010. - № 84(17). - P. 8607-16. doi: 10.1128/JVI.00159-10.
128. Ilyushina, N.A. Does pandemic A/H1N1 virus have the potential to become more pathogenic? / N.A. Ilyushina, M.F. Ducatez, J.E. Rehg et al. // *MBio* [electronic resource]. - 2010. - № 1(5). pii: e00249-10. doi: 10.1128/mBio.00249-10.
129. Imai, M. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets / M. Imai, T. Watanabe, M. Hatta et al. // *Nature*. - 2012. - №486(7403). - P. 420-428. doi: 10.1038/nature10831
130. Ito, T. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential / T. Ito, J. N. Couceiro, S. Kelm et al. // *Journal of virology*. - 1998. - № 72(9). - P. 7367-7373.

131. Ito, Y. Detection of influenza virus RNA by reverse transcription-PCR and proinflammatory cytokines in influenza-virus-associated encephalopathy / Y. Ito, T. Ichiyama, H. Kimura et al. // *Journal of medical virology*. – 1999. - № 58. – P. 420–425.
132. Itoh, Y. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses / Y. Itoh, K. Shinya, M. Kiso et al. // *Nature*. – 2009. - № 460. P. 1021–1025.
133. Jagger, B.W. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response / B.W. Jagger, H.M. Wise, J.C. Kash et al. // *Science*. - 2012. - № 337(6091). — P. 199-204.
134. Johnson, N.P. Updating the accounts: global mortality of the 1918–1920 ‘Spanish’ influenza pandemic / N.P. Johnson, J. Mueller // *Bulletin of the history of medicine*. - 2002. - № 76. - P. 105–115.
135. Joseph, T. Evaluation of replication and pathogenicity of avian influenza A H7 subtype viruses in a mouse model / T. Joseph, J. McAuliffe, B. Lu et al. // *Journal of virology*. - 2007. - № 81(19). - P.10558-10566.
136. Kao, C. Emerged HA and NA Mutants of the Pandemic Influenza H1N1 Viruses with Increasing Epidemiological Significance in Taipei and Kaohsiung, Taiwan, 2009–10 / C. Kao, T.C. Chan, C.H. Tsai et al. // *PLoS ONE*. - 2012. - V. 7 - I. 2 - e31162
137. Kao, H.T. Influenza A virus infection in infants / H.T. Kao, Y.C. Huang, T.Y. Lin // *Journal of microbiology, immunology, and infection*. - 2000. - V.33. - № 2. - P105-108.
138. Katz J.M. Serologic assays for influenza surveillance, diagnoses and vaccine evaluation / J.M. Katz, K. Hancock, X. Xu // *Expert review of anti-infective therapy*. - 2011. – Vol. 9(6). – P. 669-683.
139. Kawaoka, Y. Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells / Y. Kawaoka,

- R.G. Webster // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 1988. - № 85. - P. 324-328.
140. Kiso, M. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study / M. Kiso, K. Mitamura, Y. Sakai-Tagawa et al. // Lancet. - 2004. - V. 364. - P.759-765.
141. Kobasa, D. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus / D. Kobasa, S.M. Jones, K. Shinya et al. // Nature. – 2007. - № 445(7125). – P. 319-23.
142. Koehler, A.V. Genetic evidence of intercontinental movement of avian influenza in a migratory bird: the northern pintail (*Anas acuta*) / A.V. Koehler, J.M. Pearce, P.L. Flint et al. // Molecular ecology. – 2008. - № 17(21). – P. 4754-62. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03953.x.
143. Korteweg, C. Pandemic influenza A (H1N1) virus infection and avian influenza A (H5N1) virus infection: a comparative analysis / C. Korteweg, J. Gu // Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire. – 2010. - № 88(4). – P. 575-87. doi: 10.1139/O10-017.
144. Kuiken, T. Avian H5N1 influenza in cats / T. Kuiken, G. Rimmelzwaan, D. van Riel et al.// Science. – 2004. - № 306(5694). - P. 241.
145. Kuiken, T. Pathology of human influenza A (H5N1) virus infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) / T. Kuiken, G.F. Rimmelzwaan, G. Van Amerongen, A.D. Osterhaus // Veterinary pathology. – 2003. - № 40(3). – P. 304-10.
146. Kuiken, T. Pathology of human influenza revisited / T. Kuiken, J. Taubenberger // Vaccine. – 2008. - № 26. – D59-D66.
147. Kwon, Y.K. Bronchointerstitial Pneumonia in Guinea Pigs Following Inoculation with H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Virus / Y.K. Kwon, A.S. Lipatov, D.E. Swayne. - Veterinary pathology. Supplement.- 2009. - № 46. – P. 138–141.

148. Lamb, R. A. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. R.A. Lamb, R. M. Krug. Fields virology. Eds.: D. M., Fields, Knipe, P.M. Howley. - 3rd ed. - Philadelphia: Lippincott-Raven. - 1996. - P. 1353–1395.
149. Lamb, R. A. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: Colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins / R.A. Lamb, C.J. Lai, P. W. Choppin // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 1981. - № 78(7). - P. 4170–4174.
150. Lamb, R.A. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication / R.A. Lamb, R. M. Krug // Fields virology / Eds.: D. M., Fields, Knipe, P.M. Howley. – 4th ed. - Philadelphia: Lippincott-Raven. - 2001. - P. 1487–1531.
151. Lee, Y.H. Influenza A virus induction of oxidative stress and MMP-9 is associated with severe lung pathology in a mouse model / Y.H. Lee, C.L. Lai, S.H. Hsieh et al. // Virus research. Supplement. - 2013. - № 178(2). – P. 411-422. doi: 10.1016/j.virusres.2013.09.011
152. Leichtenstern, O. Influenza. I. Geschichte, Epidemiologie und Aetiologie der Influenza II. Pathologie und Therapie der Influenza. In: Nothnagel H, editor. Nothnagel's Spezielle Pathologie und Therapie. Vol. 4. Alfred Hölder; Vienna: 1896. PP. 1–195. Цитировано по J.K. Taubenberger and D.M. Morens, 2009.
153. Lin, T. The hemagglutinin structure of an avian H1N1 influenza A virus / T. Lin, G. Wang, A. Li et al. // Virology. - 2009. - № 392 (1). - P. 73–81.
154. Lipatov, A.S. Cross-protectiveness and immunogenicity of influenza A/Duck/Singapore/3/97(H5) vaccines against infection with A/Vietnam/1203/04(H5N1) virus in ferrets / A.S. Lipatov, E. Hoffmann, R. Salomon et al. // The Journal of infectious diseases. – 2006. - № 194(8). – P. 1040-1043.
155. Liu, Q. Combination of PB2 271A and SR polymorphism at positions 590/591 is critical for viral replication and virulence of swine influenza virus in cultured

- cells and in vivo / Q. Liu, C. Qiao, H. Marjuki et al. // *Journal of virology*. - 2012. - №86(2). - P. 1233-7.
156. Liu, Y. Altered receptor specificity and cell tropism of D222G hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A(H1N1) 2009 influenza virus / Y. Liu, R.A. Childs, T. Matrosovich et al. // *Journal of virology*. - 2010. - V. 84. - P. 12069-12074.
157. Lu, X. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans / X. Lu, T.M. Tumpey, T. Morken et al. // *Journal of virology*. - 1999. - № 73(7). - P. 5903-5911.
158. Lui, K.J. Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985 / K.J. Lui, A.P. Kendal // *American journal of public health*. - 1987. - № 77(6). - P. 712–716.
159. Lycett, S.J. Detection of mammalian virulence determinants in highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: multivariate analysis of published data/ S.J. Lycett, M.L. Ward, F.I. Lewis et al. // *Journal virology*. - 2009. - № 83. - P. 9901-9910.
160. Madjid, M. Influenza as a bioweapon / M. Madjid, S. Lillibridge, P. Mirhaji, W. Casscells // *Royal Society of Medicine Press*. - 2003. - № 96(7). -P. 345-346.
161. Maines, T.R. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals / T.R. Maines, X.H. Lu, S.M. Erb et al. // *Journal of virology*. – 2005. - № 79. – P. 11788-11800.
162. Massin, P. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses / P. Massin, S. van der Werf, N. Naffakh // *Journal virology*. - 2001. - № 75. P. 5398-5404.
163. Matsuda, K. In vitro demonstration of neural transmission of avian influenza A virus / K. Matsuda, T. Shibata, Y. Sakoda et al. // *The Journal of general virology*. - 2005. - № 86(Pt 4). - P. 1131-9.

164. McCauley, J. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere / J. McCauley et al. // IOP Publishing WHO influenza centre. 2012. <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-feb-2012.pdf>. Accessed 30 June 2015
165. McCullers, JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus / J.A. McCullers // *Clinical microbiology reviews*. – 2006. - № 19. – P. 571–582.
166. McHugh, K.J. A Novel Outbred Mouse Model of 2009 Pandemic Influenza and Bacterial Co-Infection Severity / K.J. McHugh [et al.] // *PLOS One*. - 2013. - DOI: 10.1371/journal.pone.0082865
167. Monto, A.S. Epidemiology of influenza /A.S. Monto // *Vaccine*. - 2008. - № 26 (4). - D. 45-48.
168. Morens, D.M. The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century / D.M. Morens, A.S. Fauci // *The journal of infectious Diseases*. - 2007. - № 195(7). - P. 1018–1028.
169. Morens, D.M. The 1918 influenza pandemic: Lessons for 2009 and the future / D.M. Morens, J.K. Taubenberger, H.A. Harvey, M.J. Memoli // *Critical care medicine*. - 2010. - № 34(4). - e.10-e.20.
170. Mori, I. Neuropathogenesis of influenza virus infection in mice / I. Mori, Y. Kimura // *Microbes and infection*. - 2001. - № 3(6). - P. 475-9.
171. Morishima, T. Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan / T. Morishima, T. Togashi, S. Yokota et al. // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2002. - № 35. – P. 512–517.
172. Morlighem, J.E. Mutation analysis of 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses collected in Japan during the peak phase of the pandemic / J.E. Morlighem, S. Aoki, M. Kishima et al. // *PLoS One*. - 2011. - №6(4). - e18956.

173. Murphy, B.R. and Webster, R.G. Influenza viruses // B.R. Murphy, R.G. Webster / In: Virology, edited by Fields, B.N. New York: Raven Press, 1985, p. 1179-1240.
174. Naffakh, N. Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins / N. Naffakh, A. Tomoiu, M.A. Rameix-Welti, S. van der Werf // Annual Review of Microbiology. – 2008. - № 62.- P. 403–424.
175. Nelli, R.K. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig / R.K. Nelli, S.V. Kuchipudi, G.A. White et al. // BMC veterinary research [electronic resource] - 2010. – № 6(4). - doi: 10.1186/1746-6148-6-4.
176. Neumann, G. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus / G. Neumann, T. Noda, Y. Kawaoka // Nature. - 2009. - № 459(7249). - P. 931-939.
177. Neumann, G. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic / G. Neumann, Y. Kawaoka // Emerging infectious diseases. - 2006. - № 12(6). — P. 881-886.
178. Neuzil, K.M. Influenza-associated morbidity and mortality in young and middleaged women / K.M. Neuzil, G.W. Reed, E.F. Mitchel, M.R. Griffin // JAMA : the journal of the American Medical Association. - 1999. - № 281(10). - P. 901–907.
179. OIE. 2010. Avian influenza / The World Organisation for Animal Health. Situation Update, 8 January 2014. Article 10.4.1. http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.10.4.pdf
180. Omer, S.B. Maternal influenza immunization and reduced likelihood of prematurity and small for gestational age births: a retrospective cohort study / S.B. Omer, D. Goodman, M.C. Steinhoff et al. // PLoS Medicine. - 2011. - № 8. - e1000441.
181. Osterhaus, A.D. Influenza B virus in seals // A.D.Osterhaus [et al.] / Science. - 2000. - № 288. - P. -1051-1053.

182. Ottolini M.G. The cotton rat provides a useful small-animal model for the study of influenza virus pathogenesis / M.G. Ottolini [et al.] // *The Journal of general virology*. – 2005. - № 86. – P. 2823–2830.
183. Pan, C. E14-F55 combination in M2 protein: a putative molecular determinant responsible for swine-origin influenza A virus transmission in humans / C. Pan, S. Jiang // *PLoS currents*. - 2009. - V.2. - №1. - RRN1044.
184. Pan, C. Genomic signature and mutation trend analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus / C. Pan, B. Cheung, S. Tan et al. // *PLoS One*. - 2010. - V. 5. - № 3. - e 9594.
185. Park, C.H. The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice / C.H. Park, M. Ishinaka, A. Takada et al. // *Archives of virology*. - 2002. - № 147(7):1425-1436.
186. Paulson, J. C. Interactions of animal viruses with cell surface receptors. Conn, M. (ed.), In *The Receptors Volume 2*, Academic Press, Orlando, (1985) pp. 131-219. [ISBN: 0121852024]
187. Perez-Padilla, R. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico / R. Perez-Padilla, D. de la Rosa-Zamboni, S. Ponce de Leon et al. // *The New England journal of medicine*. - 2009. - № 361(7). - P. 680–689.
188. Piedra, P.A. Influenza virus pneumonia: pathogenesis, treatment, and prevention / P.A. Piedra // *Seminars in respiratory infections*. - 1995. - V.10. - № 4. - P.216-223.
189. Pielak, R.M. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel / R.M. Pielak, J.R. Schnell, J.J. Chou // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2009. - V. 106 - № 18. - P. 7379–7384.
190. Pinto, L.H. Influenza virus M2 protein has ion channel activity / L.H. Pinto, L.J. Holsinger, R.A. Lamb // *Cell*. - 1992. - № 69(3). - P. 517-528.
191. Prokopeva, E.A. Comparative Analysis of Biological Properties of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Strains isolated in the Pandemic of 2009 and

- the Post-Pandemic Period in the Asian Part of Russia / E.A. Prokopeva, S.G Sayfutdinova, A.V Glushchenko et al. // *Virology and Microbiology*. - 2013. - № 1. P. 15-28.
192. Reid A.H. Experimenting on the past: The enigma of von Economo's encephalitis lethargica / A.H. Reid, S. McCall, J.M. Henry, J.K. Taubenberger // *Journal of neuropathology and experimental neurology*. – 2001. - № 60. P. 663–670.
193. Reid, A.H. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma / A.H. Reid, J.K. Taubenberger // *Journal of general virology*. - 2003. - № 84. - P. 2285-92.
194. Report Prepared for the WHO Annual Consultation on the Composition of Influenza Vaccine for the Northern Hemisphere. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-feb-2012.pdf> (Дата обращения 29.05.2014).
195. Rimmelzaan, G.F. Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts / G.F. Rimmelzaan, D. van Riel, M. Baars et al. // *The American journal of pathology*. – 2006. -№ 168(1). – P. 176-83.
196. Rimmelzwaan, G.F. A primate model to study the pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection / G.F. Rimmelzwaan, T. Kuiken, G. van Amerongen et al. // *Avian diseases*. - 2003. - № 47. - P. 931-933.
197. Rimmelzwaan, G.F. Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts / G.F. Rimmelzwaan [et al.] // *The American journal of pathology*. – 2006. - № 168(1). – P. 176-83.
198. Rimmelzwaan, G.F. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model / G.F. Rimmelzwaan, T. Kuiken, G. van Amerongen et al. // *Journal of virology*. – 2001. - № 75(14). – P. 6687-6691.

199. Rogers, G.N. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity / G.N. Rogers, D. van Riel, M. Baars et al. // *Nature*. – 1983. - № 304 (5921). - P. 76–78.
200. Rolling, T. Adaptive Mutations Resulting in Enhanced Polymerase Activity Contribute to High Virulence of Influenza A Virus in Mice / T. Rolling, I. Koerner, P. Zimmermann et al. // *Journal of virology*. - 2009. - № 83 (13). - P. 6673 – 6680.
201. Rota, P.A. Laboratory characterization of a swine influenza virus isolated from a fatal case of human influenza / P.A. Rota, E.R. Rocha, M.W. Harmon et al. // *Journal of clinical microbiology*. - 1989. - № 27(6). — P. 1413-1416.
202. Sakabe, S. Mutations in PA, NP, and HA of a pandemic (H1N1) 2009 influenza virus contribute to its adaptation to mice / S. Sakabe, M. Ozawa, R. Takano et al. // *Virus research. Supplement*. – 2011. - № 158(1-2). – P. 124-129. doi: 10.1016/j.virusres.2011.03.022.
203. Sakabe, S. Mutations in PA, NP, and HA of a pandemic (H1N1) 2009 influenza virus contribute to its adaptation to mice / S. Sakabe, M. Ozawa, R. Takano et al. // *Virus research*. - 2011. - №158(1-2). - P. 124–129.
204. Scholtissek, C. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2 / C. Scholtissek, W. Rohde, V. Von Hoyningen, R. Rott // *Virology*. - 1978. - № 87(1). — P. 13-20.
205. Seladi-Schulman, J. Spherical Influenza Viruses Have a Fitness Advantage in Embryonated Eggs, while Filament-Producing Strains Are Selected In Vivo / J. Seladi-Schulman, J. Steel, A. C. Lowen // *Journal of virology*. - V. 87. - № 24. - P. 13343–13353.
206. Seo, S.H. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses / S.H. Seo, E. Hoffmann, R.G. Webster // *Nature medicine*. 2002. - № 8(9). - P. 950-954.
207. Shaw, M.L. Orthomyxoviruses: Molecular Biology // M.L. Shaw, P. Palese. In: B.V.J. Mahy and M.H.V. Van Regenmortel, editors /

- Encyclopedia of virology. Third edition. Amsterdam - Boston - Heidelberg - London - New York - Oxford - Paris - San Diego - San Francisco - Singapore - Sydney - Tokyo: Elsevier Academic Press; - 2008. - PP. - 485-494.
208. Shikov, A.N. [Genetic variability of isolates of pandemic influenza A virus H1N1 isolated in Russia in 2009] [Article in Russian] / A.N. Shikov [et al.] // Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiya i virusologiya. - 2011. - №(4). - P.23-29.
209. Shinya, K. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway / K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada et al. // Nature. – 2006. - № 440(7083). – P. 435–436.
210. Shinya, K. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice / K. Shinya, S. Hamm, M. Hatta et al. // Virology. – 2004. - № 320(2). - P. 258-266.
211. Shope, R.E. Influenza: history, epidemiology, and speculation / R.E. Shope // Public health reports. - 1958. - № 73(2). — P. 165-178.
212. Short, K.R. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome / K.R. Short, E.J. Kroeze, R.A. Fouchier, T. Kuiken // The Lancet infectious diseases. – 2014. - № 14(1). – P. 57-69. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70286-X.
213. Song, M.S. Increased virulence of neuraminidase inhibitor-resistant pandemic H1N1 virus in mice: potential emergence of drug-resistant and virulent variants / M.S. Song, Y. Hee Baek, E.H. Kim et al. // Virulence. - 2013. - № 4(6). – P. 489-93. doi: 10.4161/viru.25952.
214. Steel, J. Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N / J. Steel, A.C. Lowen, S. Mubareka, P. Palese // PLoS pathogens. - 2009. - № 5. - e1000252. doi: 10.1371/journal.ppat.1000252.

215. Stevens, J. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities / J. Stevens, O. Blixt, L. Glaser et al. // *Journal of molecular biology*. - 2006. - № 355. - P. 1143–1155.
216. Studahl, M. Influenza virus and CNS manifestations / M. Studahl // *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. – 2003. - № 28. P. 225–232.
217. Suarez, D.L. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong / D.L. Suarez, M.L. Perdue, N. Cox et al. // *Journal virology*. - 1998. - № 72(8). - P. 6678-6688.
218. Subbarao, E.K. Rescue of an influenza A virus wild-type PB2 gene and a mutant derivative bearing a sitespecific temperature-sensitive and attenuating mutation / E.K. Subbarao, Y. Kawaoka, B.R. Murphy // *Journal of virology*. - 1993. - № 67. - P. 7223-7228.
219. Subbarao, K. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness / K. Subbarao, A. Klimov, J. Katz et al. // *Science*. - 1998. - № 279(5349). - P. 393-6.
220. Subbarao, K. Molecular aspects of avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans / K. Subbarao, M.W. Shaw // *Reviews in medical virology*. - 2000. - № 10. - P. 337-348.
221. Sugimura, T. Isolation of a recombinant influenza virus (Hsw 1 N2) from swine in Japan / T. Sugimura, H. Yonemochi, T. Ogawa et al. // *Archives of virology*. - 1980. - № 66(3). — P. 271-274.
222. Sweet, C. Pathogenicity of influenza virus / C. Sweet, H. Smith // *Microbiological reviews*. - 1980. - V. 44. - P. 303-330.
223. Takahashi, M. Influenza virus-induced encephalopathy: Clinicopathologic study of an autopsied case / M. Takahashi, T. Yamada, Y. Nakashita et al. //

- Pediatrics international: official journal of the Japan Pediatric Society. - 2000. - № 42. – P. 204–214.
224. Taubenberger, J.K. Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context / J.K. Taubenberger, J.V. Hultin, D.M. Morens // *Antiviral therapy*. - 2007. - № 12(4). — P. 581-591.
225. Taubenberger, J.K. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation / J.K. Taubenberger, J.C. Kash // *Cell host and microbe*. - 2010. - № 7(6). — P. 440-451.
226. Taubenberger, J.K. Initial Genetic Characterization of the 1918 “Spanish” Influenza Virus / J.K. Taubenberger, A.H. Reid, A.E. Krafft et al. // *Science*. - 1997.- V. 275. - № 5307. - P. 1793-1796. DOI: 10.1126/science.275.5307.1793
227. Taubenberger, J.K. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus / J.K. Taubenberger, A.H. Reid, T.A. Janczewski, T.G.Fanning // *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. – 2001. – № 356(1416). – P. 1829–1839.
228. Taubenberger, J.K. Pandemic influenza – including a risk assessment of H5N1 / J.K. Taubenberger, D.M. Morens // *Revue scientifique et technique* - 2009. - № 28(1). - P. 187-202.
229. Taubenberger, J.K. The 1918 influenza virus: A killer comes into view / J.K. Taubenberger, A.H. Reid, T.G. Fanning // *Virology*. – 2000. – № 274(2). – P. 241–245.
230. Taubenberger, J.K. The Origin and Virulence of the 1918 “Spanish” Influenza Virus / J.K. Taubenberger // *Proceedings of the American Philosophical Society*. - 2006. - № 150(1). - P. 86-112.
231. Thomas, Y. Survival of influenza virus on banknotes / Y. Thomas, G. Vogel, W. Wunderli et al. // *Applied and environmental microbiology*. - 2008. - № 74(10). - P. 3002-3007.

232. Tong, S. A distinct lineage of influenza A virus from bats / S. Tong, Y. Li, P. Rivaller et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2012. - № 109(11). - P. 4269-4274.
233. Tong, S. New world bats harbor diverse influenza a viruses / S. Tong, X. Zhu, Y. Li et al. // *PLoS Pathogens*. - 2013. - № 9(10). – P. 1003657.
234. Toovey, S. Influenza-associated central nervous system dysfunction: A literature review/ S. Toovey // *Travel medicine and infectious disease*. – 2008. - № 6. P. 114–124.
235. Tumpey, T.M. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission / T.M. Tumpey, T.R. Maines, N. Van Hoeven et al. - *Science*. - 2007. - № 315. - P. 655-659.
236. Tumpey, T.M. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus / T.M. Tumpey, C.F. Basler, P.V. Aguilar et al. // *Science*. – 2005. - № 310. – P. 77–80.
237. Tumpey, T.M. Depletion of lymphocytes and diminished cytokine production in mice infected with a highly virulent influenza A (H5N1) virus isolated from humans / T.M. Tumpey, X. Lu, T. Morken et al. // *Journal of virology*. – 2000. - № 74(13). – P. 6105-6116.
238. van Dijk, J.G. Juveniles and migrants as drivers for seasonal epizootics of avian influenza virus / G. van Dijk, B.J. Hoyer, J.H. Verhagen et al. // *The Journal of animal ecology*. – 2014. - № 83(1). – P. 266-75. doi: 10.1111/1365-2656.12131.
239. Van Hoeven, N. Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air / N. Van Hoeven, C. Pappas, J.A. Belser et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2009. - № 106. - P. 3366-3371.
240. van Riel, D. H5N1 virus attachment to lower respiratory tract / D. van Riel, V.J. Munster, E. de Wit et al. // *Science*. - 2006. – № 312(5772). – P. 399.

241. van Riel, D. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals / D. van Riel, V.J. Munster, E. de Wit et al. // *The American journal of pathology*. – 2007. – № 171. – P. 1215–1223.
242. Varga, Z.T. The influenza A virus protein PB1-F2: killing two birds with one stone? / Z.T. Varga, P. Palese // *Virulence*. - 2011. - № 2(6). — P. 542-546.
243. Ware, L.B. The acute respiratory distress syndrome / L.B. Ware, M.A. Matthay // *The New England journal of medicine*. – 2000. - № 342. – P. 1334–1349.
244. WEB проект: “Практика гистолога” [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://practicagystologa.ru/96.html> (Дата обращения: 18.05.2014).
245. Webster, R.G. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G. Webster [et al.] // *Microbiological reviews*. -1992. - № 56(1). - P. 152–179.
246. Webster, R.G. H5N1 outbreaks and enzootic influenza / R.G. Webster, M. Peiris, H. Chen, Y. Guan et al. // *Emerging infectious diseases*. – 2006. – № 12 (1). – P. 3–8.
247. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance / R. Webster, N. Cox, K. Stöhr - Global Influenza Programme World Health Organization, Switzerland, 2010 – 99 p.
248. WHO. 2007. Dictionary of terms. World Health Organization. Situation Update, 8 January 2014. http://apps.who.int/gb/pip/pdf_files/PIP_IGM_ID3-en.pdf
249. WHO. 2009. Pandemic (H1N1) 2009—update 64. / World Health Organization. Situation Update, 8 January 2014. http://www.who.int/csr/don/2010_05_28/en/index.html.
250. WHO. 2010b. Evolution of a pandemic A(H1N1) 2009, April 2009 – March 2010. World Health Organization. Situation Update, 8 March 2014. http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599924_eng.pdf

251. WHO. 2012. H5N1 research issues. World Health Organization. Situation Update, 18 March 2014. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/h5n1_research/en/
252. WHO. 2014. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/
253. WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza // WHO. 2011 - 153 p.
254. Wilson, J.C. Influenza // In: Wilson JC, Da Costa JM, editors / A treatise on the continued fevers. New York, NY: William Wood & Co.; 1881. pp. 10–45. Цитированно по D.M. Morens et al, 2010.
255. Wright, P.F., Neumann G., Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott, Williams and Wilkins; 2007. - P. 1691–1740.
256. Xie, Z. Identification of a Triple-Reassortant H1N1 Swine Influenza Virus in a Southern China Pig / Z. Xie, M. Zhang, L. Xie et al. // Genome announcements [electronic resource]. – 2014. - № 2(2). pii: e00229-14. doi: 10.1128/genomeA.00229-14.
257. Xu, L. Adaption of seasonal H1N1 influenza virus in mice / L. Xu, L. Bao, F. Li et al. // PLoS One. – 2011. - № 6(12):e28901. doi: 10.1371/journal.pone.0028901.
258. Xu, L. Rapid adaptation of avian H7N9 virus in pigs / L. Xu, L. Bao, W. Deng et al. // Virology. – 2014. - № 452-453. – P. 231-6. doi: 10.1016/j.virol.2014.01.016.
259. Yamada, S. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors / S. Yamada, Y. Suzuki, T. Suzuki et al. // Nature. - 2006. - № 444. - P. 378-382.

260. Ye, J. Variations in the hemagglutinin of the 2009 H1N1 pandemic virus: potential for strains with altered virulence phenotype? / J. Ye, E.M. Sorrell, Y. Cai et al. // PLoS Pathogens. - 2010. - V. 6 - I. 10 - e1001145

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение № 1



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

**ФГБУ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
КЛИНИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
КОМИТЕТ по БИМЕДИЦИНСКОЙ ЭТИКЕ**

630117, г.Новосибирск
ул. Академика Тимакова, 2

Тел./факс: (3832)33-64-56
sck@soramn.ru

РЕШЕНИЕ №25

о возможности проведения научно-исследовательской работы

Рассмотрев вопросы обеспечения прав, безопасности и охраны здоровья испытуемых при выполнении научного исследования: «Эпидемиологическая ситуация по гриппу в России с 2009 по 2013 гг., в рамках проекта «Разработка многопараметрической тест-системы для диагностики сезонного гриппа» (Государственный контракт от 29 сентября 2011 г. №16.522.12.2011, Руководитель – Шестопалов А.М., д.б.н., заведующий отделом зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Комитет по биомедицинской этике при ФГБУ НЦКЭМ СО РАМН на заседании *19.11.2012* протокол №25 принял решение о возможности проведения данной научно-исследовательской работы.

Председатель ЭК при ФГБУ «НЦКЭМ» СО РАМН,
д.м.н.

Члены ЭК:

Зам. директора ФГБУ «НЦКЭМ» СО РАМН по
научной работе, д.м.н., профессор

Зам. директора ФГБУ «НЦКЭМ» СО РАМН по
инновационной и экономической работе, к.м.н.

Руководитель лаборатории цитологии и клеточных
культур, ФГБУ «НЦКЭМ» д.б.н.

Главный врач

Клиники ФГБУ «НЦКЭМ» СО РАМН

 Ю.А. Николаев

 В. Г. Селятицкая

 Н.Г. Лузгина

 С.А. Архипов

 Н.А. Долгова

« *19* » « *ноябрь* » 2012 г.



**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

От 26.03.2015 № 165

На № _____ от _____

Справка о депонировании
штаммов микроорганизмов

СПРАВКА

Лаборатория эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России приняла в музей вирусов гриппа и ОРЗ на патентное депонирование штаммы вирусов гриппа А:

1. A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09) – присвоен номер **5409**
2. A/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09), полученный путём адаптации к мышам CD1 – присвоен номер **5410**
3. A/Tomsk/273-MA1/2010(H1N1pdm09), полученный путём адаптации к мышам линии BALB/c – присвоен номер **5411**
4. A/Tomsk/273-MA2/2010(H1N1pdm09), полученный путём адаптации к мышам линии C57BL/6z – присвоен номер **5412**

Авторы штаммов: **Прокопьева Е.А., Глушенко А.В., Шестопапов А.М.**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И
КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ» (НИИЭКМ)
Адрес: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2
Тел./факс приемной: (383) 333-64-56

Депозитор: Музей вирусов гриппа и ОРЗ
Лаборатория эволюционной изменчивости вирусов гриппа
ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России
Адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17
Тел.: (812) 499 15 22

Директор ФГБУ НИИ гриппа
Академик РАН, профессор



О.И. КИСЕЛЕВ

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2011

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение

**«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)**

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПОСТУПЛЕНИИ ЗАЯВКИ

| | | |
|-------------------------|-------------------|--------------------------|
| 13.03.2015 | 014241 | 2015108981 |
| <i>Дата поступления</i> | <i>Входящий №</i> | <i>Регистрационный №</i> |

Иск № 557/30.15 12.03.2015

| | | | |
|--|--|---|------------|
| ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ оригиналов документов заявки 13 MAR 2015 ФИПС ОТД 17 | | (21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ № | ВХОДЯЩИЙ № |
| <input type="checkbox"/> (86) <i>(регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные национальным ведомством)</i> | | (85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу | |
| <input type="checkbox"/> (87) <i>(номер и дата международной публикации международной заявки)</i> | | АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ <i>(полный почтовый адрес, для лиц интеллектуальной собственности)</i> Новосибирский государственный университет Отдел управления ИС, Беляевой Н.А. Ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия Телефон: (383)363-41-61 E-mail: ois@lab.nsu.ru АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ <i>(указывается при наличии заявки на патентные изобретения)</i> | |
| ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение | | В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., 30, корп.1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993 | |
| (54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Панель адаптированных пандемических штаммов вируса гриппа А/Tomsk/273/2010- МА1(H1N1pdm09), А/Tomsk/273/2010-МА2(H1N1pdm09) и А/Tomsk/273/2010- МА3(H1N1pdm09) для оценки действия противовирусных препаратов | | | |
| (71) ЗАЯВИТЕЛЬ <i>(Указывается полное имя или наименование (согласно учредительному документу), место жительства или место нахождения, включая название страны и полный почтовый адрес)</i> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (Новосибирский государственный университет, НГУ) Улица Пирогова, 2 Новосибирск, 630090, Россия Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины" (НИИЭКМ) Улица Тимякова, 2, Новосибирск, 630117, Россия | | | |
| | | ОГРН 1025403658565 | |
| | | 1025403653538 | |
| | | КОД страны по стандарту ВОИС ST. 3 RU <i>(если он установлен)</i> | |
| (74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ <i>Указание(ие) ниже лица(а) назначено(назначены) заявителем(заявителями) для ведения дела по получению патента от его(их) имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам</i> | | Является <input type="checkbox"/> Патентным(и) поверенным(и) <input type="checkbox"/> Иным представителем Телефон: Факс: E-mail: | |
| Фамилия, имя, отчество Адрес: | | | |
| Срок представительства <i>(указывается в случае назначения иного представителя без предоставления доверенности)</i> | | Регистрационный (е) номер (е) патентного(их) поверенного(их) | |

Банк заявлений ИЗ лист 1

| | | |
|--|----|------------------------------------|
| Количество листов | 59 | Фамилия лица, принявшего документы |
| Количество документов, подтверждающих уплату пошлины | 1 | |
| Количество изображений | 0 | |

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2522822

**СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ-ПРАЙМЕРЫ,
ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ PB2, PB1, PA, NP, MP,
NS НИЗКОПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА ПТИЦ.**

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет" (Новосибирский государственный университет, НГУ) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2012143573

Приоритет изобретения **11 октября 2012 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **21 мая 2014 г.**

Срок действия патента истекает **11 октября 2032 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов



Автор(ы): *Сивай Мария Владимировна (RU), Шаршов Кирилл Александрович (RU), Прокопьева Елена Александровна (RU), Дурыманов Александр Гаврилович (RU), Шестопалов Александр Михайлович (RU)*

Протокол об использовании адаптированного варианта вируса гриппа А(H1N1)pdm09 штамм А/Tomsk/273-МАЗ/2010(H1N1pdm09) в доклиническом исследовании специфической активности окисленных декстранов "Исследование профилактической эффективности окисленных декстранов с молекулярной массой 40 кДа (декстраналь 40, диальдегид декстран 40, ОД - 40) и 70 кДа (декстраналь 70, диальдегид декстран 70, ОД - 70) при интраназальном введении на модели гриппа у мышей"

| | |
|--|-------------------------------------|
| ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФГБУ «НЦКЭМ» СО РАМН | Код исследования: ОД / ПГ / 2014 |
| ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОКИСЛЕННЫХ ДЕКСТРАНОВ | Стр. 1/20 |

**ПРОТОКОЛ № 1
ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ОКИСЛЕННЫХ ДЕКСТРАНОВ**

Исследование профилактической эффективности окисленных декстранов с молекулярной массой 40 кДа (декстраналь 40, диальдегид декстран 40, ОД - 40) и 70 кДа (декстраналь 70, диальдегид декстран 70, ОД - 70) при интраназальном введении на модели гриппа у мышей

Код исследования: ОД / ПГ / 2014

Заказчик (разработчик) лекарственного средства: ОАО «ФНИЦ «Алтай»
г. Бийск, ул. Социалистическая, 1

Исследовательское учреждение: ФГБУ «НЦКЭМ» СО РАМН
630117, г. Новосибирск,
ул. Тимакова, 2 на базе вивария
ГНУ ИЭВС и ДВ Россельхозакадемии
630501, р.п. Краснообск, Новосибирского р-на, Новосибирской обл.

Ответственный исполнитель исследования: Шестопалов А.М.