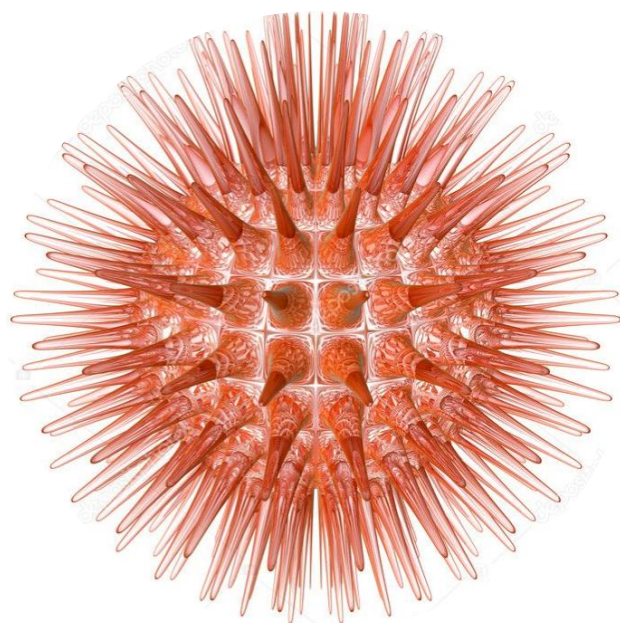
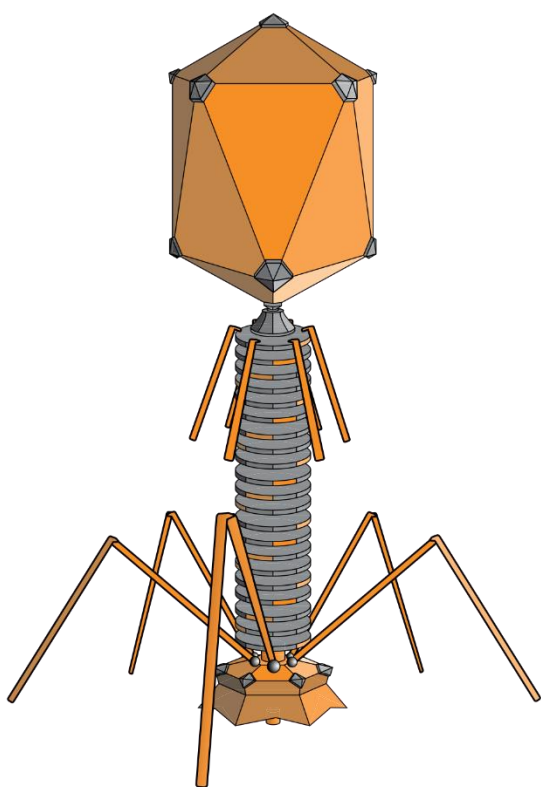


ВИРУСЫ: ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ВИРУС ГРИППА



Оглавление

Общая вирусология.....	3
Классификация вирусов	5
Взаимодействие вируса с клеткой	5
.....	6
Репродукция вирусов.....	6
Абортивный тип взаимодействия вирусов с клеткой	12
Интегративный тип взаимодействия вирусов с клеткой (виrogenия)	12
Культивирование вирусов	14
Бактериофаги	22
Практическое применение фагов.....	27
Прионы и вироиды.....	28
Ортомиксовирусы (вирусы гриппа).....	29



Общая вирусология

Вирусы относятся к *царству Virae* (от лат. *virus* — яд). Это мельчайшие микробы, не имеющие клеточного строения, белоксинтезирующей и энергетических систем, содержащие один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК). Вирусы как облигатные внутриклеточные паразиты размножаются в цитоплазме или ядре клетки. Они являются автономными генетическими структурами и отличаются особым, разобщенным (*дизъюнктивным*) способом размножения (репродукции): в клетке отдельно синтезируются нуклеиновые кислоты вирусов и их белки, затем происходит их сборка в вирусные частицы.

Сформированная вирусная частица, находящаяся вне клетки называется **вирионом**.

Форма вирионов может быть различной. Различают ДНК- и РНК-содержащие вирусы. Вирусы обычно гаплоидны, т.е. имеют один набор генов. Исключением являются ретровирусы, имеющие диплоидный геном. Геном вирусов содержит от шести до нескольких сотен генов и представлен различными видами нуклеиновых кислот: двунитевыми, однопитевыми, линейными, кольцевыми, фрагментированными.

Среди однопитевых РНК-содержащих вирусов различают вирусы с плюс-нитью РНК и минус-нитью РНК (полярность РНК).

- **Плюс-нить РНК** (позитивная нить) выполняет наследственную (геномную) функцию и функцию информационной РНК, являясь матрицей для белкового синтеза на рибосомах инфицированной клетки. Плюс-нить РНК является инфекционной: при введении в чувствительные клетки она способна вызвать инфекционный процесс.
- **Минус-нить** (негативная нить) выполняет только наследственную функцию; для синтеза белка на минус-нити РНК синтезируется комплементарная ей нить.
- **Амбиполярная нить**, т.е. содержит плюс- и минус-сегменты РНК.

Геном вирусов способен включаться в геном клетки в виде **провируса**, проявляя себя генетическим паразитом клетки. Нуклеиновые кислоты некоторых вирусов, например, герпеса, могут находиться в цитоплазме инфицированных клеток, напоминая плазмиды.

В зависимости от строения вирусы делятся на:

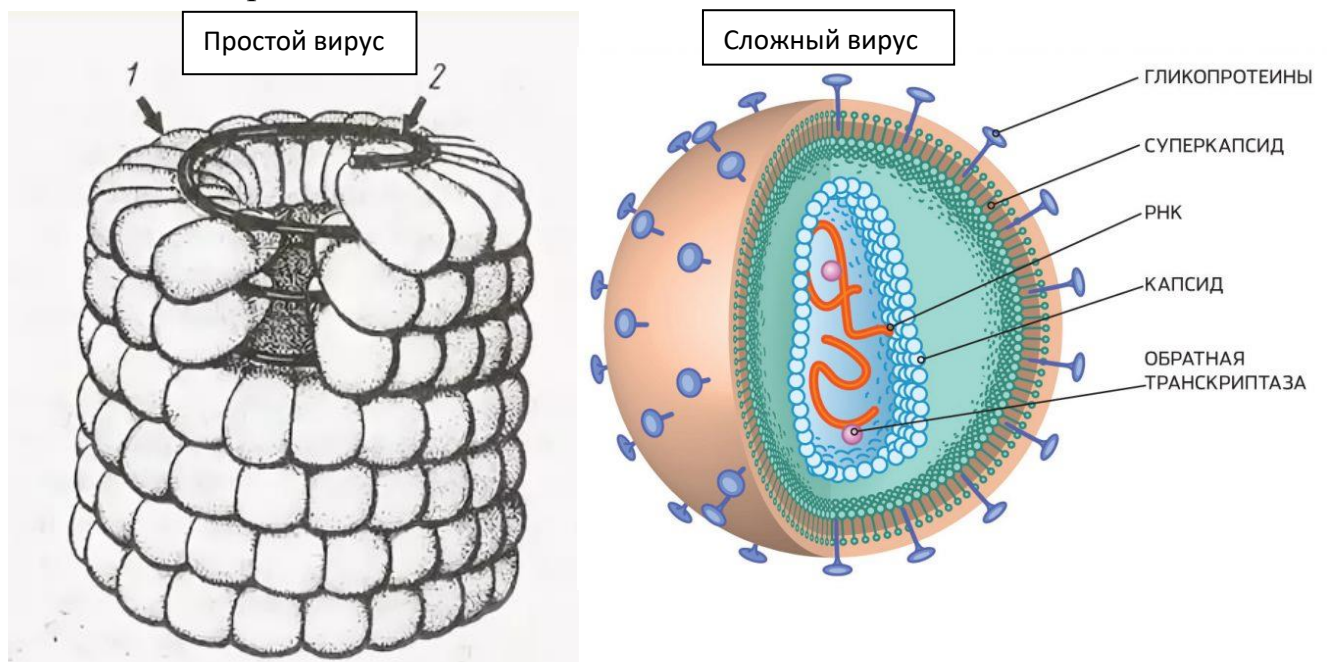
1. **Простые, или без оболочечные вирусы** имеют только нуклеиновую кислоту, связанную с белковой структурой, называемой капсидом. Протеины, связанные с нуклеиновой кислотой, известны как нуклеопротеины, а ассоциация вирусных протеинов капсида вируса с вирусной нуклеиновой кислотой названа нуклеокапсидом. **Капсид** включает повторяющиеся морфологические субъединицы — капсомеры, скомпонованные из нескольких полипептидов. Капсид



защищает нуклеиновую кислоту от деградации. У простых вирусов капсид участвует в прикреплении (адсорбции) к клетке хозяина. Простые вирусы выходят из клетки в результате ее разрушения (лизиса).

2. **Сложные**, или **оболочечные**, **вирусы** кроме капсида имеют мембранную двойную липопротеиновую **оболочку** – суперкапсид, которая приобретается путем почкования вириона через мембрану клетки, например, через плазматическую мембрану, мембрану ядра или эндоплазматического ретикулума. На оболочке вируса расположены гликопротеиновые шипы-пепломеры.

Капсид и оболочка (суперкапсид) защищают вирионы от воздействия окружающей среды, обуславливают избирательное взаимодействие (адсорбцию) с определенными клетками, а также антигенные и иммуногенные свойства вирионов.



1-капсид 2-ген.материал

Внутренние структуры вирусов называют **сердцевиной**. У аденовирусов сердцевина состоит из гистоноподобных белков, связанных с ДНК, у реовирусов — из белков внутреннего капсида.

Вирусы имеют структурные и неструктурные белки. Неструктурные белки участвуют в репродукции вирусов, а структурные белки обуславливают строение вирусов.

Классификация вирусов

Вирусы классифицируют по типу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), количеству и свойствам ее нитей: двунитевые или однонитевые нуклеиновые кислоты; позитивная (+), негативная (–) полярность нуклеиновой кислоты или смешанная полярность нуклеиновой кислоты — амбиполярная; линейная или циркулярная нуклеиновая кислота; фрагментированная или нефрагментированная нуклеиновая кислота. Учитывают также размер и морфологию вирионов, количество капсомеров и тип симметрии нуклеокапсида, наличие оболочки (суперкапсида), место размножения в клетке, антигенные свойства и т.п.

Вид вируса не получил биномиального названия!

Взаимодействие вируса с клеткой

Вирусы — облигатные внутриклеточные паразиты, способные только к внутриклеточному размножению. В вирусинфицированной клетке возможно пребывание вирусов в различных состояниях, что приводит к следующим эффектам:

- 1) разрушение клетки в результате **некроза** или **апоптоза**, в результате чего наблюдается «цитопатический эффект» — клетки округляются, отделяются от соседних клеток, образуются многоядерные гигантские клетки, вакуоли и включения;
- 2) разрушение клеток не самим вирусом, а иммунными реакциями организма;
- 3) вирус, находясь внутри клетки, не разрушает ее (латентная инфекция) или трансформирует клетку организма в раковую клетку.

Типы взаимодействия

1. **Продуктивный тип** взаимодействия завершается воспроизводством вирусного потомства — многочисленных вирионов — и гибелью зараженных клеток (*цитотоксическое действие*, вызванное простыми вирусами). Сложные вирусы выходят из клеток почкованием, не разрушая их (*нецитотоксическое действие*).

2. **Абортивный тип** — не завершается образованием новых вирионов, поскольку инфекционный процесс в клетке прерывается на одном из этапов.

3. **Интегративный тип**, или вирогенеза, характеризуется встраиванием (интеграцией) вирусной ДНК в виде **провируса** в хромосому клетки и их совместным сосуществованием (совместная репликация).





Репродукция вирусов

Продуктивный тип взаимодействия вируса с клеткой, т.е. **репродукция** вируса, проходит в несколько стадий:

- 1) адсорбция вириона на клеточной мембране;
- 2) проникновение вириона в клетку, «раздевание» и высвобождение вирусного генома (депротеинизация вируса);
- 3) синтез вирусных компонентов;
- 4) формирование вирионов (сборка реплицированной нуклеиновой кислоты и новых капсидных белков);
- 5) выход вирионов из клетки.

Адсорбция вирусов. Первая стадия репродукции вирусов — адсорбция, т.е. прикрепление вириона к поверхности клетки. Она протекает в две фазы.

Первая фаза — неспецифическая, вызванная ионным притяжением между вирусом и клеткой, включая и другие механизмы.

Вторая стадия- высокоспецифическая, обусловленная гомологией, комплементарностью рецепторов чувствительных клеток и «узнающих» их белковых лигандов вирусов. Белки на поверхности вирусов, узнающие специфические клеточные рецепторы и взаимодействующие с ними, называются **прикрепительными**.

Наличие специфических рецепторов лежит в основе избирательности поражения вирусами определенных клеток, тканей и органов. Это так называемый **тропизм**.

Проникновение вирусов в клетку происходит рецепторзависимым эндоцитозом или в результате слияния оболочки вируса с клеточной мембраной. Возможно сочетание этих механизмов.



внутриклеточную репродукцию вируса на разных его этапах; структурных белков, которые входят в состав вириона.

К *неструктурным белкам* относятся:

- 1) ферменты синтеза РНК или ДНК (РНК- или ДНК-полимеразы), обеспечивающие транскрипцию и репликацию вирусного генома;
- 2) белки-регуляторы;
- 3) предшественники вирусных белков, отличающиеся своей нестабильностью в результате быстрого нарезания на структурные белки;
- 4) ферменты, модифицирующие вирусные белки, например, протеиназы и протеинкиназы.

Синтез белков в клетке осуществляется в соответствии процессами *транскрипции и трансляции*. Передача наследственной информации в отношении синтеза иРНК у разных групп вирусов неодинакова.

- ДНК-содержащие вирусы реализуют генетическую информацию так же, как и клеточный геном, по схеме: **геномная ДНК вируса → транскрипция иРНК → трансляция белка вируса**. Причем ДНК-содержащие вирусы используют для этого процесса клеточную полимеразу или собственную РНК-полимеразу.
- Плюс-нитевые РНК-содержащие вирусы имеют геном, выполняющий функцию иРНК; он распознается и транслируется рибосомами. Синтез белков у этих вирусов осуществляется без акта транскрипции по схеме: **геномная РНК вируса → трансляция белка вируса**.
- Минус-однонитевые РНК-содержащие вирусы имеют геном, выполняющий роль матрицы, с которой транскрибируется иРНК при участии РНК-полимеразы, связанной с нуклеиновой кислотой вируса. Синтез белка у них происходит по схеме: **геномная РНК вируса → транскрипция иРНК → трансляция белка вируса**.
- Ретровирусы имеют уникальный диплоидный геном, состоящий из двух идентичных молекул РНК. В составе ретровирусов есть особый вирусоспецифический фермент — обратная транскриптаза, или ревертаза, с помощью которой осуществляется процесс обратной транскрипции, т.е. на матрице геномной РНК синтезируется комплементарная однонитевая ДНК. Комплементарная нить ДНК копируется с образованием двунитевой комплементарной ДНК, которая интегрируется в клеточный геном и в его составе транскрибируется в иРНК с помощью клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Синтез белков для этих обратнотранскрибирующихся вирусов осуществляется по схеме: **геномная РНК вируса → комплементарная ДНК → транскрипция иРНК → трансляция белка вируса**.



Репликация вирусных геномов, т.е. синтез вирусных нуклеиновых кислот, приводит к накоплению в клетке копий исходных вирусных геномов, которые используются при сборке вирионов. Способ репликации генома зависит от типа нуклеиновой кислоты вируса.

Механизм репликации отличается у вирусов, имеющих:

- 1) двунитевую ДНК;
- 2) однонитевую ДНК;
- 3) плюс-однонитевую РНК;
- 4) минус-однонитевую РНК;
- 5) двунитевую РНК;
- 6) идентичные плюс-нитевые РНК (ретровирусы).

1. **Двунитевые ДНК-вирусы.** Репликация двунитевых вирусных ДНК происходит обычным полуконсервативным механизмом: после расплетения нитей ДНК к ним комплементарно достраиваются новые нити. Каждая вновь синтезированная молекула ДНК состоит из одной родительской и одной вновь синтезированной нити. В репликации вирусных геномов участвуют вирусные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы или клеточные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы. У этих вирусов, транскрипция вирусного генома происходит в ядре.

2. **Однонитевые ДНК-вирусы.** Используют клеточные ДНК-полимеразы для создания двунитевого вирусного генома. При этом на исходной вирусной ДНК (плюс-нить) комплементарно синтезируется минус-нить ДНК, служащая матрицей для синтеза плюс-нити ДНК нового вириона. Параллельно синтезируется иРНК, происходит трансляция вирусных пептидов.

3. **Плюс-однонитевые РНК-вирусы**, у которых геномная плюс-нить РНК выполняет функцию иРНК — матрицы для синтеза белка. Вирусная РНК-полимераза транскрибирует геномную плюс-нить РНК в минус-нить РНК, на матрице которой синтезируется геномная плюс-нить РНК.

4. **Минус-однонитевые РНК-вирусы** имеют геномную минус-нить РНК, которая трансформируется вирионной РНК-зависимой РНК-полимеразой в неполные и полные плюс-нити РНК. Полные копии являются матрицей (промежуточная стадия) для синтеза минус-нитей геномной РНК потомства.

5. **Двунитевые РНК-вирусы** сходны по репликации с минус-однонитевыми РНК-вирусами. Образовавшиеся в процессе транскрипции плюс-нити функционируют не только как иРНК, но и участвуют в репликации: они служат матрицами для синтеза минус-нитей РНК. Последние в комплексе с плюс-нитеями РНК образуют геномные двунитевые РНК вирионов. Репликация вирусных нуклеиновых кислот этих вирусов происходит в цитоплазме клеток.

6. **Вирусы с обратной транскрипцией** Вирионная обратная транскриптаза ретровирусов синтезирует (на матрице РНК-вируса) минус-



нить ДНК, с которой копируется плюс-нить ДНК с образованием двойной нити ДНК, замкнутой в кольцо. Далее двойная нить ДНК интегрирует с хромосомой клетки, образуя **провирус**. Многочисленные вирионные РНК образуются в результате транскрипции одной из нитей интегрированной ДНК при участии клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы.

Формирование вирусов. Вирионы формируются путем самосборки: составные части вириона транспортируются в места сборки вируса — участки ядра или цитоплазмы клетки. Соединение компонентов вириона обусловлено наличием гидрофобных, ионных, водородных связей и стерического соответствия. Существуют следующие общие принципы сборки вирусов:

- Формирование вирусов — многоступенчатый процесс с образованием промежуточных форм, отличающихся от зрелых вирионов по составу полипептидов.
- Сборка простых вирусов заключается во взаимодействии вирусных нуклеиновых кислот с капсидными белками и в образовании нуклеокапсидов.
- У сложных вирусов сначала формируются нуклеокапсиды, которые взаимодействуют с модифицированными мембранами клеток (будущей липопротеиновой оболочкой вируса).
- Сборка вирусов, реплицирующихся в ядре клетки, происходит с участием мембраны ядра, а сборка вирусов, репликация которых идет в цитоплазме, осуществляется с участием мембран эндоплазматической сети или плазматической мембраны, куда встраиваются гликопротеины и другие белки оболочки вируса.
- У ряда сложных минус-нитевых РНК-вирусов в сборку вовлекается так называемый матриксный белок (М-белок), который расположен под модифицированной клеточной мембраной. Обладая гидрофобными свойствами, он выполняет роль посредника между нуклеокапсидом и вирусной липопротеиновой оболочкой.
- Сложные вирусы в процессе формирования включают в свой состав некоторые компоненты клетки хозяина, например, липиды и углеводы.

Выход вирусов из клетки.

Полный цикл репродукции вирусов завершается через 5–6 ч или через несколько суток. Процесс репродукции вирусов заканчивается выходом их из клетки, который происходит взрывным путем или почкованием, экзоцитозом.

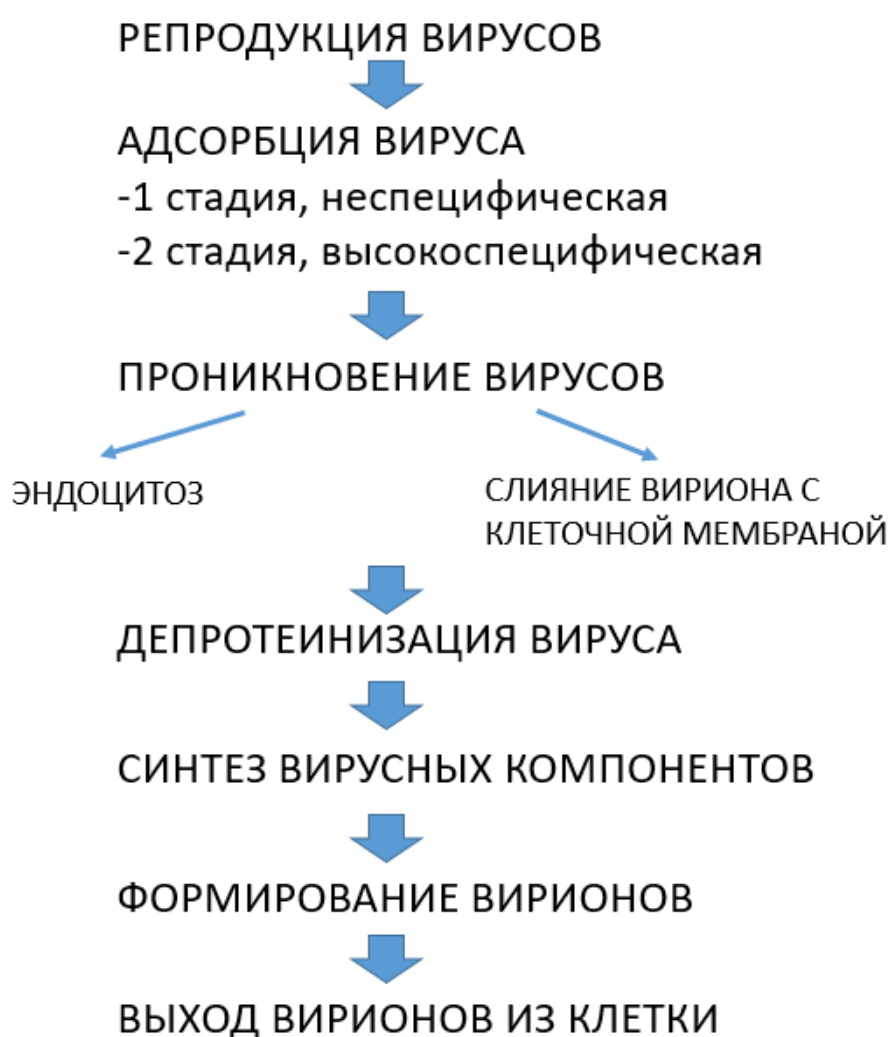
- **Взрывной путь:** из погибающей клетки одновременно выходит большое количество вирионов. По взрывному пути выходят из клетки простые вирусы, не имеющие липопротеиновой оболочки.
- **Почкование, экзоцитоз** присущи вирусам с липопротеиновой оболочкой, которая является производной от клеточных мембран. Сначала образовавшийся нуклеокапсид или сердцевина вириона



транспортируются к клеточным мембранам, в которые уже встроены вирусоспецифические белки. Затем в области контакта нуклеокапсида или сердцевины вириона с клеточной мембраной начинается выпячивание этих участков. Сформировавшаяся почка отделяется от клетки в виде сложного вируса. При этом клетка способна длительно сохранять жизнеспособность и продуцировать вирусное потомство.

Почкование вирусов, формирующихся в цитоплазме, может происходить либо через плазматическую мембрану, либо через мембраны эндоплазматической сети с последующим их выходом на поверхность клетки.

Вирусы, формирующиеся в ядре клетки, почкуются в перинуклеарное пространство через модифицированную ядерную мембрану, приобретая таким образом липопротеиновую оболочку. Затем они переносятся в составе цитоплазматических везикул на поверхность клетки.



Абортивный тип взаимодействия вирусов с клеткой

Этот тип взаимодействия не завершается образованием вирусного потомства и может возникать при следующих обстоятельствах:

- 1) заражение чувствительных клеток **дефектными вирусами** или дефектными вирионами;
- 2) заражение стандартным вирусом генетически резистентных к нему клеток;
- 3) заражение стандартным вирусом чувствительных клеток в непермиссивных (неразрешающих) условиях.

Различают дефектные вирусы и дефектные вирионы

- *Дефектные вирусы* существуют как самостоятельные виды, которые репродуцируются лишь при наличии вируса-помощника (например, вирус гепатита D репродуцируется только при наличии вируса гепатита В).
- *Дефектные вирионы* обычно лишены части генетического материала и могут накапливаться в популяции многих вирусов при множественном заражении клеток.
- *Дефектные интерферирующие частицы* (ДИ-частицы) интерферируют с репродукцией стандартного вируса и подавляют воспроизводство вирусного потомства.

Абортивный тип взаимодействия чаще наблюдается при заражении нечувствительных клеток стандартным вирусом. Механизм генетически обусловленной резистентности клеток к вирусам широко варьирует.

Абортивный тип взаимодействия может также возникать при изменении условий, в которых происходит репродукция вирусов: повышение температуры организма, изменение рН в очаге воспаления, введение в организм противовирусных препаратов и др. При устранении неразрешающих условий абортивный тип переходит в продуктивный тип взаимодействия вирусов с клеткой.

Интегративный тип взаимодействия вирусов с клеткой (виrogenия)

Это взаимное сосуществование вируса и клетки в результате интеграции (встраивания) нуклеиновой кислоты вируса в хромосому клетки хозяина. При этом интегрированный геном вируса реплицируется и функционирует как составная часть генома клетки.

Интегративный тип взаимодействия характерен для умеренных ДНК-содержащих бактериофагов, так и РНК-содержащих (например, вирус иммунодефицита человека). Для интеграции с геномом клетки необходимо

наличие кольцевой формы двунитовой ДНК-вируса. Геном ДНК-содержащих вирусов в кольцевой форме прикрепляется к клеточной ДНК в месте гомологии нуклеотидных последовательностей и встраивается в определенный участок хромосомы при участии ряда ферментов (рестриктаз, эндонуклеаз, лигаз).

У РНК-содержащих вирусов (ВИЧ) процесс интеграции более сложный. Он начинается с механизма обратной транскрипции, который заключается в синтезе комплементарной нити ДНК на матрице вирусной РНК с помощью вирусоспецифического фермента обратной транскриптазы (ревертазы). После образования двунитовой ДНК и замыкания ее в кольцо происходит интеграция ДНК-транскрипта в хромосому клетки. Встроенная в хромосому клетки ДНК вируса называется *провирсом*, или провирусной ДНК. Провирус реплицируется в составе хромосомы и переходит в геном дочерних клеток, т.е. состояние вирогении наследуется. Однако под влиянием некоторых физических или химических факторов провирус может исключаться из хромосомы клетки и переходить в автономное состояние с развитием продуктивного типа взаимодействия с клеткой.

Сохранение вирусной информации в виде провируса в составе клеточного генома, и передача ее потомству лежат в основе персистенции вирусов в организме и развития латентных (скрытых) вирусных инфекций.

Латентная инфекция поддерживается в инфицированной клетке в виде вирусной ДНК, интегрированной в геном клетки, или в виде множественных копий ковалентно замкнутой циркулярной ДНК вируса.

Культивирование вирусов

Культивирование вирусов человека и животных проводят в целях лабораторной диагностики вирусных инфекций, для изучения патогенеза и иммунитета при вирусных инфекциях, а также для получения диагностических и вакцинных препаратов. Вирусы культивируют на трех биологических моделях: в организме лабораторных животных, в развивающихся эмбрионах птиц (чаще на куриных эмбрионах) и культурах клеток (тканей).

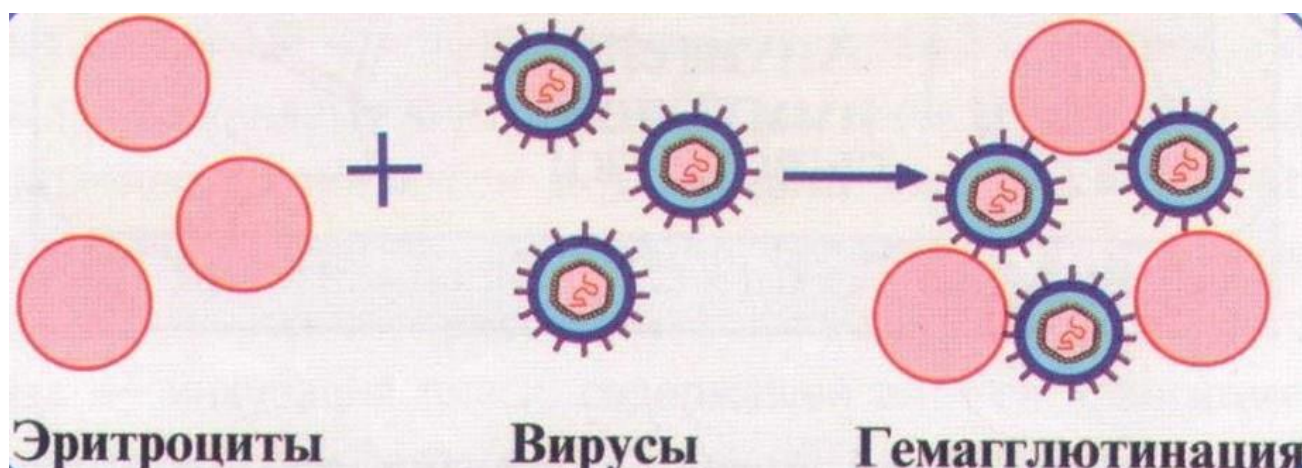
Выращенные вирусы определяют с помощью методов индикации и идентификации.

Индикация вирусов, т.е. обнаружение факта их репродукции, основана на выявлении различных биологических свойств вирусов и особенностей их взаимодействия с чувствительными клетками.

Идентификация (определение вида, типа) вирусов осуществляется в основном с помощью иммунологических реакций, основанных на взаимодействии антигенов вирусов и соответствующих им антител.

Лабораторных животных заражают исследуемым вирусосодержащим материалом различными способами в зависимости от тропизма вирусов. Использование животных для культивирования вирусов в диагностических целях весьма ограничено из-за видовой невосприимчивости животных ко многим вирусам человека, контаминации животных посторонними микробами, а также по экономическим и этическим соображениям.

О репродукции вирусов в организме животных судят по развитию у них видимых клинических проявлений заболевания, патоморфологическим изменениям органов и тканей, а также на основании **реакции гемагглютинации** (РГА) с суспензией из органов, содержащих вирусы. РГА основана на способности многих вирусов вызывать склеивание (агглютинацию) эритроцитов человека, птиц и млекопитающих в результате взаимодействия вирусных белков (гемагглютининов) с рецепторами эритроцитов.



РГА

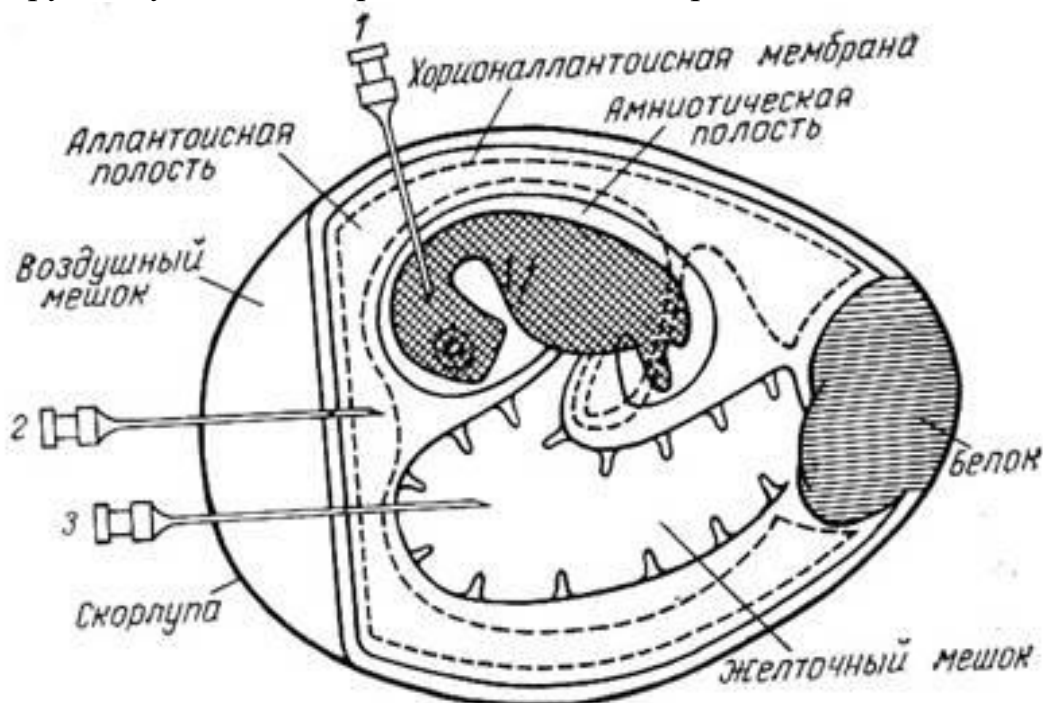
Куриные эмбрионы (5–12-дневные) заражают путем введения, исследуемого материала в различные полости и ткани зародыша. Таким образом можно культивировать вирусы гриппа, герпеса, натуральной оспы и др. Достоинствами модели являются:

- возможность накопления вирусов в больших количествах;
- отсутствие скрытых вирусных инфекций;
- доступность для любой лаборатории.

Минусы данной модели:

- многие вирусы не размножаются в эмбрионах птиц;

Вирუს могут вводить в различные части эмбриона



О репродукции вирусов в куриных эмбрионах свидетельствуют:

- специфические поражения оболочек и тела эмбриона (оспины, кровоизлияния);
- гибель эмбриона;
- положительная РГА с вирусосодержащей жидкостью, полученной из полостей зараженного зародыша.

Методику культивирования вирусов в развивающихся эмбрионах птиц используют при промышленном выращивании вирусов.

Культуру клеток (тканей) наиболее часто применяют для культивирования вирусов. Клетки, полученные из различных органов и тканей человека, животных, птиц и других биологических объектов, размножают вне организма на искусственных питательных средах в специальной лабораторной посуде. Большое распространение получили культуры клеток из эмбриональных и опухолевых тканей, обладающих по

сравнению с нормальными клетками взрослого организма более активной способностью к росту и размножению.

При выращивании культур клеток необходимо выполнение ряда условий:

- 1) соблюдение правил асептики;
- 2) использование лабораторной посуды из нейтрального стекла (пробирки, флаконы, матрасы) или специальных реакторов для получения биотехнологической продукции;
- 3) использование сложных питательных сред (среда 199, Игла), содержащих минеральные соли, аминокислоты, витамины, глюкозу, сыворотку крови животных или человека и буферные растворы, стабилизирующие рН;
- 4) добавление антибиотиков к питательной среде для подавления роста посторонних микробов;
- 5) соблюдение оптимальной температуры (36–38,5 С) роста клеток.

В зависимости от техники приготовления различают однослойные, суспензионные и органные культуры клеток.

Однослойные культуры клеток. Клетки способны прикрепляться и размножаться на поверхности химически нейтрального стекла лабораторной посуды в виде монослоя. Они получили наибольшее применение в вирусологии.

Суспензионные культуры клеток. Клетки размножаются во всем объеме питательной среды при постоянном ее перемешивании с помощью магнитной мешалки или во вращающемся барабане. Их используют для получения большого количества клеток, например, при промышленном получении вирусных вакцин.

Органые культуры — цельные кусочки органов и тканей, сохраняющие исходную структуру вне организма (применяются ограниченно).

Культуры клеток в процессе их культивирования способны проходить десятки генераций. По числу жизнеспособных генераций культуры клеток подразделяют на:

- 1) первичные, или первично-трипсинизированные;
- 2) перевиваемые, или стабильные;
- 3) полуперевиваемые.

Первичные культуры клеток способны размножаться только в первых генерациях, т.е. выдерживают не более 5–10 пассажей после выделения из тканей. В основе получения первичных культур лежит обработка кусочков тканей (эмбриональных, опухолевых или нормальных) протеолитическими ферментами, например, трипсином, который разрушает межклеточные связи в тканях и органах с образованием изолированных клеток. Данную культуру

клеток используют для подсчета количества вирионов, находившихся в пат. материале.

Перевиваемые (стабильные) культуры клеток способны размножаться в лабораторных условиях неопределенно длительный срок (десятки лет), т.е. выдерживают многочисленные пассажи. Их получают главным образом из опухолевых или эмбриональных тканей, обладающих большой потенцией роста. Перевиваемые культуры клеток имеют преимущества перед первичными культурами. К ним относятся:

- продолжительность их культивирования,
- высокая скорость размножения опухолевых и эмбриональных клеток,
- меньшая трудоемкость,
- способность культур сохранять свои свойства в замороженном состоянии в течение многих лет,
- возможность использования международных линий культур во многих лабораториях мира.

Однако злокачественный характер клеток и соматические мутации, претерпеваемые нормальными клетками в процессе многочисленных генераций, ограничивают использование этого вида культур в частности невозможно их применение в производстве вирусных вакцин.

Полуперевиваемые культуры клеток имеют ограниченную продолжительность жизни и выдерживают 40–50 пассажей. Их обычно получают из диплоидных клеток эмбриона человека. В процессе пассажей эти культуры сохраняют диплоидный набор хромосом, характерный для соматических клеток исходной ткани, и не претерпевают злокачественной трансформации. Поэтому полуперевиваемые культуры клеток могут быть использованы как в диагностике, так и в производстве вакцин.

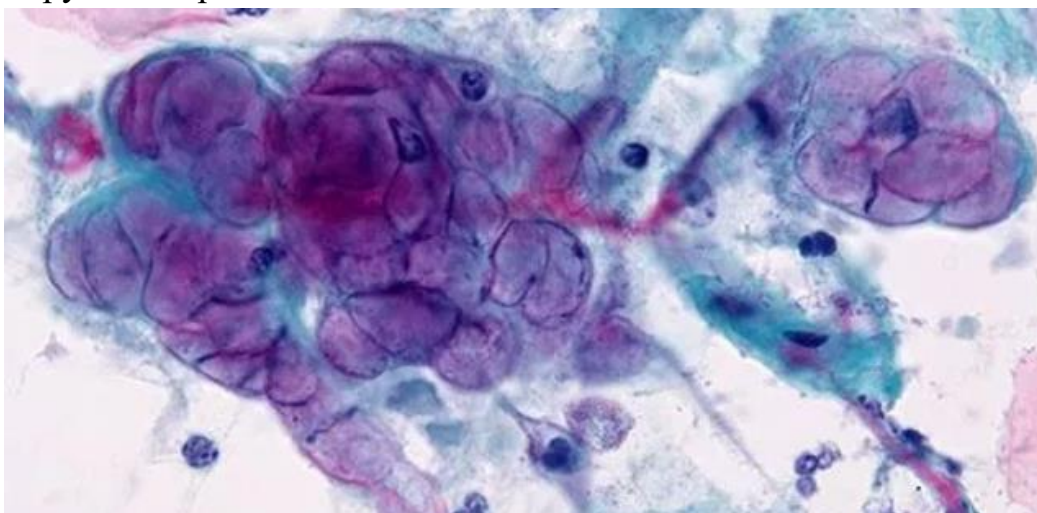
О репродукции вирусов в культуре клеток, зараженных вирусосодержащим материалом, можно судить на основании следующих феноменов:

1. цитопатогенного действия вирусов, или цитопатического эффекта, образования внутриклеточных включений;
2. образования «бляшек»;
3. реакций гемадсорбции и гемагглютинации;
4. «цветной» реакции.

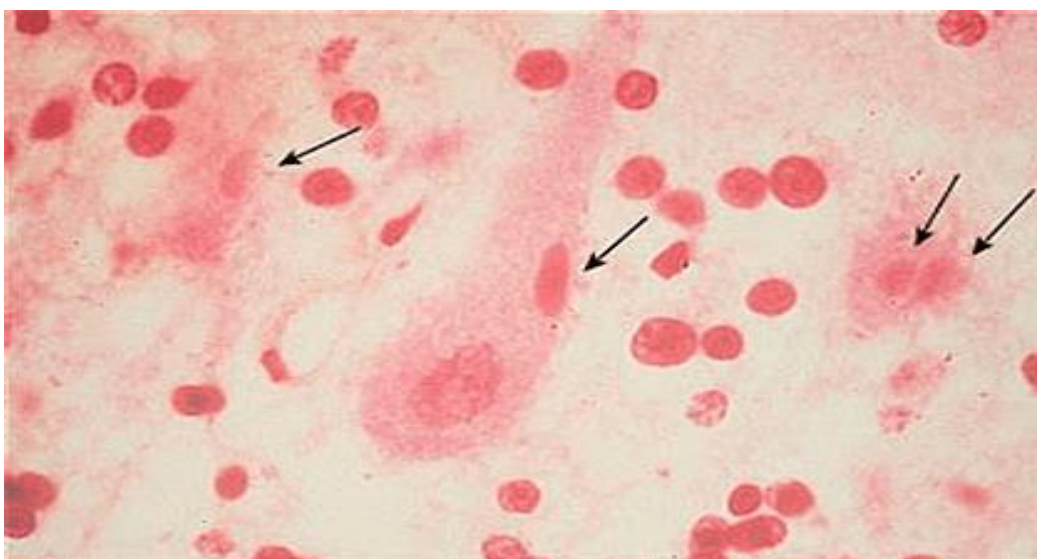
Цитопатогенное действие (ЦПД) — патологические изменения морфологии клеток, вплоть до их гибели, возникающие в результате репродукции вирусов и наблюдаемые под микроскопом. В зависимости от особенностей репродуцирующихся вирусов ЦПД может отличаться. В одних случаях быстро вакуолизируется цитоплазма, разрушаются митохондрии, округляются и гибнут клетки, а в других — формируются гигантские



многоядерные клетки (так называемые симпласты), или наблюдается явление клеточной пролиферации, которое в итоге заканчивается деструкцией клеток. Таким образом, характер ЦПД позволяет использовать этот феномен не только для индикации вирусов, но и для их ориентировочной идентификации в культуре клеток. Некоторые вирусы можно обнаружить и идентифицировать по внутриклеточным **включениям**, которые образуются в ядре или цитоплазме зараженных клеток. Часто включения представляют собой скопления вирусных частиц или отдельных компонентов вирусов, иногда могут содержать клеточный материал. Выявляют включения с помощью светового или люминесцентного микроскопа после окрашивания зараженных клеток соответственно анилиновыми красителями или флюорохромами. Включения могут отличаться по величине, форме и численности. Характерные цитоплазматические включения формируются в клетках, инфицированных вирусом натуральной оспы (тельца Гварниери), бешенства (тельца Бабеша—Негри), а внутриядерные включения — при заражении аденовирусами или вирусами герпеса.



гигантские многоядерные клетки



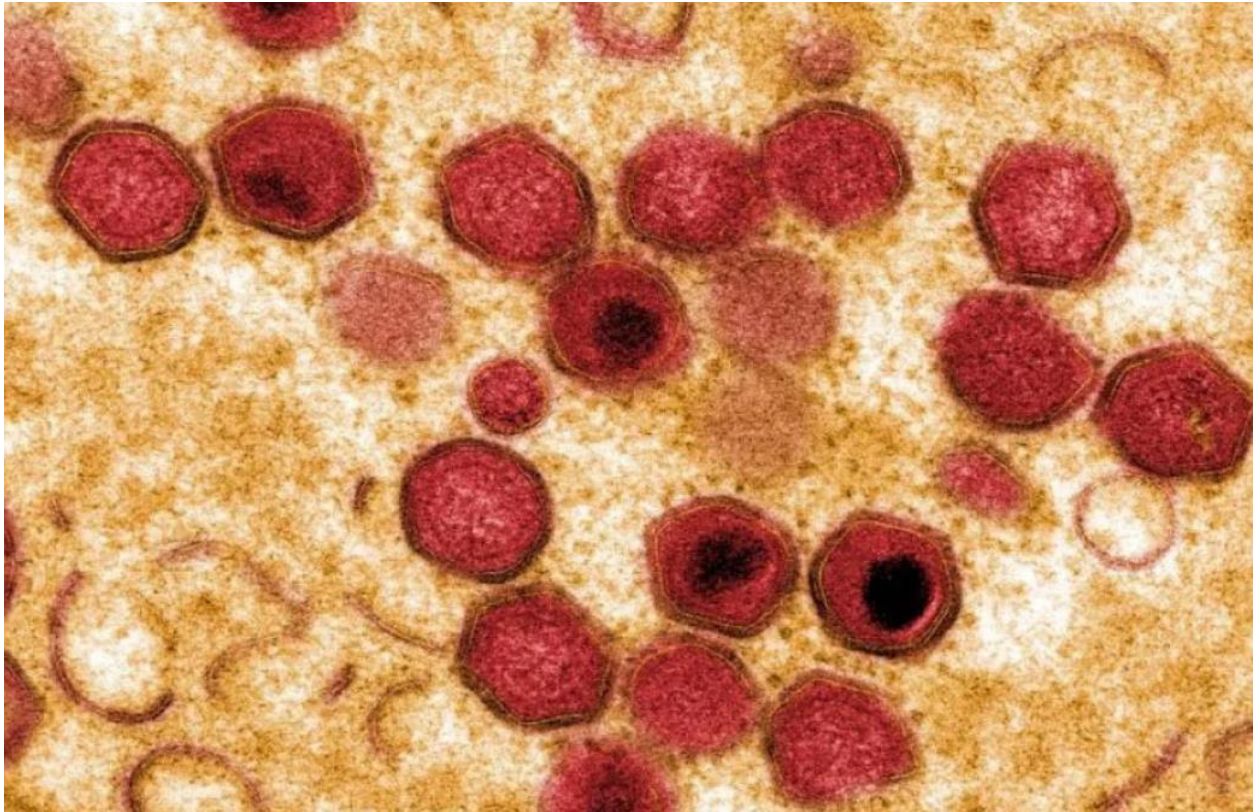
тельца Бабеша-Негри при бешенстве

«Бляшки», или **«негативные колонии»**, — ограниченные участки разрушенных вирусами клеток в сплошном монослое культуры клеток, культивируемых на питательной среде под агаровым покрытием. Они видны невооруженным глазом в виде светлых пятен на фоне окрашенного монослоя живых клеток. Добавление агара в питательную среду ограничивает распространение вирусов по всему монослою после выхода их из разрушенной клетки и обеспечивает взаимодействие вирусов только с соседними клетками. Каждая «бляшка» образуется потомством одного вириона. Подсчитав количество «бляшек», можно определить концентрацию вирусов в исследуемом материале. Кроме того, «бляшки» разных групп вирусов отличаются по размеру, форме, срокам появления. Поэтому данный метод используют для дифференциации вирусов, а также для селекции штаммов и получения чистых линий вирусов.



«бляшки» /негативные колонии

Реакция гемадсорбции основана на способности культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты. Целый ряд вирусов обладают гемадсорбирующими свойствами, что позволяет использовать реакцию гемадсорбции для индикации этих вирусов даже без выраженного ЦПД в культуре клеток. Механизмы реакции гемадсорбции и гемагглютинации сходны. Поэтому для обнаружения репродукции некоторых вирусов в культуре клеток можно использовать реакцию гемагглютинации с культуральной жидкостью, т.е. с питательной средой, содержащей размножившиеся вирусы.



гемадсорбция

«Цветная» реакция. Она регистрируется по изменению цвета индикатора, находящегося в питательной среде для культур клеток. Если вирусы не размножаются в культуре клеток, то живые клетки в процессе своего метаболизма выделяют кислые продукты, изменяющие рН среды и соответственно цвет индикатора. При репродукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается (клетки гибнут), и среда сохраняет первоначальный цвет индикатора.



цветная реакция

в пробирке слева не зафиксировано нахождение вируса, т.к. индикатор поменял свой цвет (он покраснел, среда стала кислой)

в пробирке справа отмечено нахождение вируса, т.к. цвет индикатора не изменился

Способ культивации	Преимущества	Недостатки	Индикация вируса
Лабораторные животные	-выделение вируса из смеси микроорганизмов (например, при использовании пат. материала с сопутствующей микрофлорой)	-видовая невосприимчивость; -контаминация посторонними микробами; -экономические и этические соображения.	-видимые клинические проявления; -патоморфологические изменения органов и тканей; -реакция гемагглютинации.
Куриные эмбрионы	-возможность накопления вирусов в больших количествах; -отсутствие скрытых вирусных инфекций; -доступность для любой лаборатории.	-многие вирусы не размножаются в эмбрионах птиц;	-специфические поражения оболочек и тела эмбриона (оспины, кровоизлияния); -гибель эмбриона; -положительная РГА с вирусосодержащей жидкостью, полученной из полостей зараженного зародыша.
Культура клеток	-возможность посчитать количество вирионов в пат.матерале; -получение большого количества восприимчивых к вирусу клеток.	-использование сложных и дорогостоящих технологий; -этические соображения (т.к. часто используется абортный материал).	-цитопатогенного действия вирусов; -образования «бляшек»; -реакций гемадсорбции и гемагглютинации; -«цветной» реакции.

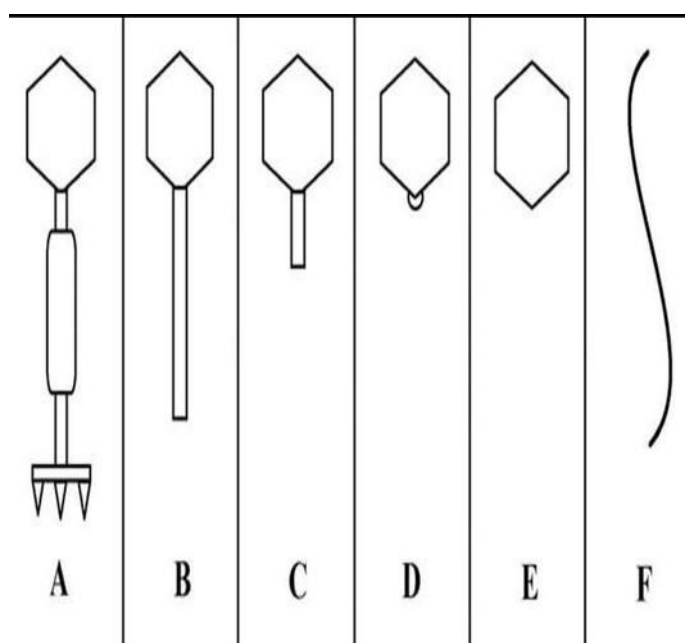
Бактериофаги

Бактериофаги, или фаги, — вирусы бактерий, специфически проникающие в бактерии и паразитирующие в них вплоть до гибели (лизиса) бактериальной клетки.

Бактериофаги широко распространены: они выявлены у большинства бактерий, а также у других микроорганизмов, например, у грибов. Поэтому бактериофаги в широком смысле слова часто называют просто **фагами**.

Бактериофаги принято обозначать буквами латинского, греческого или русского алфавита, часто с цифровым индексом, перед которыми стоит название вида бактерий (например, фаги *E. coli* T2). Для обозначения группы родственных фагов используют родовые и видовые названия микробов, из которых выделены соответствующие фаги: колифаги, стафилофаги, актинофаги, микофаги.

Строение бактериофагов изучают с помощью электронной микроскопии. В зависимости от формы и структурной организации фаги подразделяют на несколько морфологических типов: нитевидные; мелкие кубические (некоторые из них имеют аналоги отростков); фаги сперматозоидной формы, т.е. с кубической головкой и хвостовым отростком, имеющие сокращающийся или несокращающийся чехол отростка.



А-фаг, сперматозоидной формы с сокращающимся чехлом отростка

В-фаг, сперматозоидной формы с длинным несокращающимся чехлом отростка

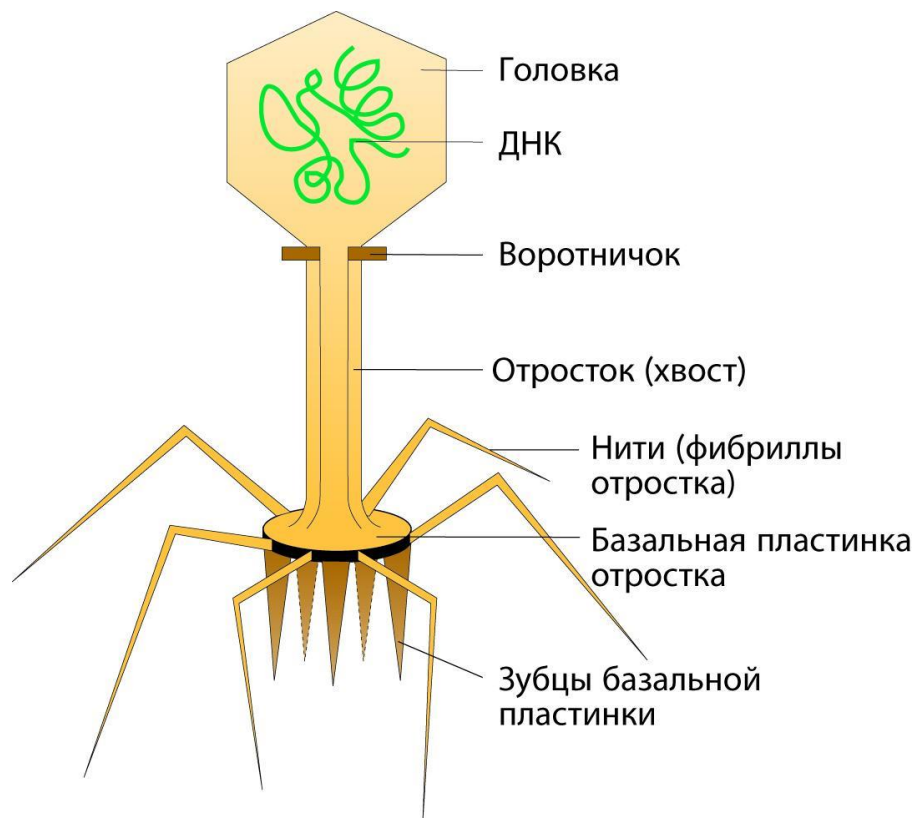
С-фаг, сперматозоидной формы с коротким несокращающимся чехлом отростка

Д-фаг, без отростка, с капсомерами

Е-фаг, без отростка и капсомеров

F-нитевидный фаг

Наиболее изучены крупные бактериофаги, имеющие форму сперматозоида и сокращающийся чехол отростка, например, колифаги. Они состоят из головки икосаэдрического типа и хвостового отростка. Хвостовой отросток имеет внутри полый цилиндрический стержень, сообщающийся с головкой, а снаружи — чехол, способный к сокращению, наподобие мышцы. Чехол присоединен к воротничку, окружающему стержень около головки. На дистальном конце отростка имеется шестиугольная базальная пластинка с шипами, от которых отходят нитевидные структуры — *фибриллы* (нити). Бактериофаги содержат или ДНК, или РНК.



Нуклеиновые кислоты фагов могут быть двунитевыми, однострунчатыми, линейными, кольцевыми. Большинство фагов содержит двунитевую ДНК, замкнутую в кольцо.

У фагов, имеющих форму сперматозоида, одна молекула двунитевой суперспирализованной ДНК находится внутри головки и защищена капсидом.

Капсид состоит из белковых молекул — идентичных полипептидных субъединиц, уложенных по икосаэдрическому (кубическому) типу симметрии.

Сокращающийся чехол хвостового отростка образован также белковыми субъединицами, уложенными по спиральному типу симметрии, содержащими АТФ и ионы Ca^{2+} .

У некоторых фагов (например, T2) в дистальной части отростка содержится фермент лизоцим.

Антигенные свойства. Бактериофаги содержат группоспецифические и типоспецифические антигены, обладают иммуногенными свойствами. По типоспецифическим антигенам фаги делят на серотипы.

Резистентность. По сравнению с вирусами человека бактериофаги более устойчивы к факторам окружающей среды. Инактивируются под действием температуры 65–70 С, УФ-облучения в высоких дозах, ионизирующей радиации, формалина и кислот. Длительно сохраняются при низкой температуре и высушивании.

Взаимодействие фагов с бактериальной клеткой. Бактериофаги инфицируют строго определенные бактерии, взаимодействуя со специфическими рецепторами клетки. По специфичности взаимодействия различают следующие бактериофаги:

- **поливалентные**, взаимодействующие с родственными видами бактерий;
- **моновалентные**, взаимодействующие с бактериями определенного вида;
- **типовые**, взаимодействующие с отдельными типами (вариантами) бактерий данного вида.

Взаимодействие фагов с бактериями может протекать, как и у других вирусов, по продуктивному, абортивному и интегративному типам.

При **продуктивном** типе взаимодействия образуется фаговое потомство, бактерии лизируются;

При **абортивном** типе — фаговое потомство не образуется и бактерии сохраняют свою жизнедеятельность;

При **интегративном** типе — геном фага встраивается в хромосому бактерии и сосуществует с ней.

В зависимости от типа взаимодействия различают вирулентные и умеренные бактериофаги.

Вирулентные бактериофаги взаимодействуют с бактерией по продуктивному типу. Для внедрения в бактерию они адсорбируются на специфических рецепторах клетки, в том числе на липополисахариде, липопротеине, тейхоевых кислотах, протеинах или даже на пиллях. Проникнув в бактерию, они репродуцируются с образованием 200–300 новых фаговых частиц и вызывают лизис бактерий.

Фаги, имеющие хвостовой отросток, прикрепляются к бактериальной клетке свободным концом отростка (фибриллами, базальной пластинкой). Проникновение фаговой нуклеиновой кислоты в бактерию наиболее изучено у бактериофагов, имеющих отросток с сокращающимся чехлом. В результате активации АТФ чехол хвостового отростка сокращается, и стержень с помощью лизоцима, растворяющего прилегающий фрагмент клеточной стенки, как бы просверливает оболочку клетки. При этом ДНК фага,



содержащаяся в его головке, проходит в форме нити через канал хвостового стержня и инъецируется в клетку, а капсид фага остается снаружи бактерии.

Некоторые мелкие кубические фаги, способные адсорбироваться на половых пилях, вводят свою нуклеиновую кислоту через канал этих пилей. ДНК нитевидных фагов проходит в бактерию вместе с одним из капсидных белков. Инъецированная внутрь бактерии нуклеиновая кислота подавляет биосинтез компонентов клетки, заставляя ее синтезировать нуклеиновую кислоту и белки фага. Эти процессы схожи с репродукцией вирусов человека. После образования компонентов фага происходит самосборка частиц: сначала пустотелые капсиды головок заполняются нуклеиновой кислотой, затем сформированные головки соединяются с хвостовыми отростками. В результате изменения внутриклеточного осмотического давления и действия фагового лизоцима происходит разрушение оболочки, лизис бактерии и выход фагов из нее.

Умеренные бактериофаги в отличие от вирулентных взаимодействуют с чувствительными бактериями либо по продуктивному, либо по интегративному типу. Продуктивный цикл умеренного фага идет в той же последовательности, что и у вирулентных фагов, и заканчивается лизисом клетки. При интегративном типе взаимодействия ДНК умеренного фага встраивается в хромосому бактерии, реплицируется синхронно с геномом размножающейся бактерии, не вызывая ее лизиса. ДНК бактериофага, встроенная в хромосому бактерии, называется *профагом*, а культура бактерий-*лизогенной*. Такое сосуществование бактерии и умеренного бактериофага называется *лизогенией*. Профаг, ставший частью хромосомы бактерии, при ее размножении передается по наследству потомкам. После проникновения в бактерию ДНК умеренного фага приобретает форму кольца, а затем интегрирует по типу кроссинговера в строго определенную гомологичную область хромосомы клетки.

Итак, при лизогении *образование фагового потомства не происходит*. В основе «сдерживающего» механизма репродукции фагов лежит образование в бактерии специфического репрессора — низкомолекулярного белка, подавляющего транскрипцию фаговых генов. Биосинтез репрессора детерминируется генами профага. Наличием репрессора можно объяснить способность лизогенных бактерий приобретать иммунитет (невосприимчивость) к последующему заражению гомологичным или близкородственными фагами. Под иммунитетом в данном случае понимается такое состояние бактерии, при котором исключается процесс вегетативного размножения вышеуказанных фагов и лизис клетки.

Однако термин «лизогения» отражает потенциальную возможность лизиса бактерии, содержащей профаг. Действительно, профаги некоторой части лизогенной культуры бактерий могут спонтанно (самопроизвольно) или направленно под действием ряда физических или химических факторов дерепрессироваться, исключаться из хромосомы, переходить в вегетативное



состояние. Этот процесс заканчивается продукцией фагов и лизисом бактерий. Частота спонтанного лизиса бактерий в лизогенных культурах невелика. Частоту лизиса бактерий можно значительно увеличить, воздействуя на лизогенную культуру *индуцирующими агентами* (УФ-лучи, ионизирующее излучение, перекисные соединения, митомицин С и др.). Сам же феномен воздействия, приводящий к инактивации репрессора, называется *индукцией* профага. Явление индукции используют в генной инженерии. Однако спонтанный лизис лизогенных культур может нанести вред микробиологическому производству. Так, если микроорганизмы — продуценты биологически активных веществ оказываются лизогенными, существует опасность перехода фага в вегетативное состояние, что приведет к лизису производственного штамма этого микроба.

Геном профага может придавать бактерии новые, ранее отсутствовавшие у нее свойства. Этот феномен изменения свойств микроорганизмов под влиянием профага получил название *фаговой конверсии*. Конвертироваться могут морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и другие свойства бактерий.

Умеренные фаги могут быть дефектными, т.е. неспособными образовывать зрелые фаговые частицы ни в естественных условиях, ни при индукции. Геном некоторых умеренных фагов может находиться в цитоплазме бактериальной клетки в так называемой плазмидной форме, не включаясь в ее хромосому. Такого рода умеренные фаги используют в качестве векторов в генной инженерии.



Практическое применение фагов

Бактериофаги используют в лабораторной диагностике инфекций при внутривидовой идентификации бактерий, т.е. определении фаговара (фаготипа). Для этого применяют метод **фаготипирования**, основанный на строгой специфичности действия фагов: на чашку с плотной питательной средой, засеянной «газоном» чистой культурой возбудителя, наносят капли различных диагностических типоспецифических фагов. Фаговар бактерии определяется тем типом фага, который вызвал ее лизис (образование стерильного пятна, «бляшки», или «негативной колонии», фага). Методику фаготипирования используют для выявления источника и путей распространения инфекции (эпидемиологическое маркирование). Выделение бактерий одного фаговара от разных больных указывает на общий источник их заражения.



Образование «бляшек» в бактериальной культуре клеток

По содержанию бактериофагов в объектах окружающей среды (например, в воде) можно судить о присутствии в них соответствующих патогенных бактерий. Подобные исследования проводят при эпидемиологическом анализе вспышек инфекционных болезней.

Фаги применяют также для лечения и профилактики ряда бактериальных инфекций. Производят брюшнотифозный, сальмонеллезный, дизентерийный, синегнойный, стафилококковый, стрептококковый фаги и комбинированные препараты (колипротейный, пиобактериофаги и др). Бактериофаги назначают по показаниям перорально, парентерально или местно в виде жидких, таблетированных форм, свечей или аэрозолей.

Бактериофаги широко применяют в генной инженерии в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.

Прионы и вириоды

Близки к вирусам, т.к. не имеют собственных белоксинтезирующих и энергетических систем.

Прионы — инфекционные белковые частицы, вызывающие конформационные болезни в результате изменения структуры нормального клеточного прионового протеина, который имеется в организме животных и человека и выполняет ряд регуляторных функций.

Прионные болезни протекают по типу трансмиссивных губкообразных энцефалопатий, относятся к группе медленных вирусных инфекций: необычно длительный инкубационный период, медленно прогрессирующее течение, патологические изменения опустошительного характера исключительно в нервной ткани, отсутствие признаков инфекционного воспаления и иммунного ответа, неизбежно летальный исход.

Другими необычными инфекционными агентами, близкими к вирусам, являются **вириоды** — небольшие молекулы кольцевой суперспирализованной РНК, не содержащие белка и вызывающие заболевания растений.



Ортомиксовирусы (вирусы гриппа)

Таксономия. Ортомиксовирусы- это РНК-содержащие сложноорганизованные вирусы. Семейство включает имеющие наибольшее значение в патологии человека три рода вирусов гриппа — Influenzavirus А (поражает человека и некоторые виды животных), Influenzavirus В (поражает только людей) и Influenzavirus С (поражает только людей чаще новорожденных).

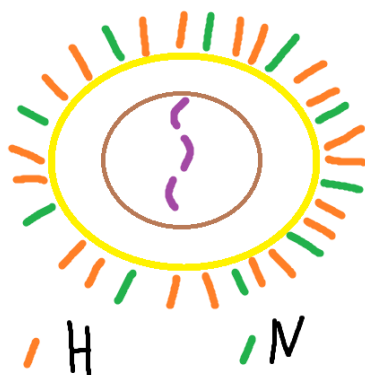
Вирусы гриппа А поражают не только людей, но и животных и отличаются значительным антигенным разнообразием и наибольшей эпидемиологической опасностью.

Грипп-острое инфекционное вирусное заболевание человека, характеризующееся поражением респираторного тракта, лихорадкой, общей интоксикацией, нарушением деятельности сердечно-сосудистой и нервной систем.

Морфология и состав вириона. Вирион сферической формы, крупный, но в свежевыделенных препаратах от больного могут встречаться нитевидные формы значительной длины. В центре вириона расположен нуклеокапсид, имеющий спиральный тип симметрии. Геном представлен однонитевой сегментированной минус-РНК (вирусы А и В имеют 8 сегментов, вирус С — только 7), с которой связаны белки полимеразного комплекса. Сегментированная РНК вирусов предрасположена к генетическим рекомбинациям. Капсид состоит в основном из белка — нуклеопротеина (NP). Нуклеокапсид окружен слоем матриксного белка М1 и мембранного белка М2. Поверх этих структур располагается липопротеиновая оболочка, за счет которой вирусы гриппа чувствительны к эфиру. Липопротеиновая оболочка имеет клеточное происхождение. Она несет на своей поверхности гликопротеиновые шипы (длиной около 10 нм): гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА). Количество гемагглютинина в 5 раз больше количества нейраминидазы. У вирусов типа С нейраминидазы нет. НА и НА кодируются вирусным геномом и в процессе репродукции вирусов встраиваются в мембрану клетки хозяина. Таким образом, выходя из клетки, вирусы покрываются оболочкой, уже содержащей НА и НА.

На поверхности обоих гликопротеинов есть специальные области для связывания с рецепторами. Гемагглютинины вируса гриппа связываются с рецепторами чувствительных клеток, а затем нейраминидаза их модифицирует и вирус проникает в клетку путем эндоцитоза. Нейраминидаза участвует также в выходе из клетки новых вирионов (препятствует агрегации вирионов). Кроме того, она снижает вязкость секретов, облегчая проникновение вируса в нижние отделы респираторного тракта. Оба гликопротеина могут быть получены в очищенном виде, что важно для производства субъединичных гриппозных вакцин, содержащих эти цельные молекулы.





Репродукция. Для вирусов гриппа специфическими рецепторами являются соединения, содержащие сиаловую кислоту.

Кроме того, у молекул гемагглютинаина разнообразных вирусов может быть разное строение «рецепторного кармана», который связывается с рецептором, образуя «эндоцитарную вакуоль», в результате чего вирус проходит внутрь клетки путем эндоцитоза. В клетке происходит частичная депротеинизация, и сердцевина вириона транспортируется к ядру клетки. На ядерной оболочке происходит завершение депротеинизации, т.е. удаление матриксного белка (М-белок), и в ядро проникает нуклеокапсид. В ядре клетки происходит транскрипция генов. При репликации генома, которая идет в ядре клеток, транскрибируется вся нить сегмента РНК.

Сначала образуется плюс-нить, затем на матрице образуется минус-нить дочерних РНК. Сборка нуклеокапсида происходит в ядре. Формирование вирусных частиц идет на клеточных мембранах, в которые к этому времени уже встроены гемагглютинин и нейраминидаза, а выход из клетки происходит путем «почкования».

Антигенная структура. Вирусы гриппа имеют внутренние и поверхностные антигены. Внутренние антигены представлены нуклеопротеином (NP-белком) и М-белками (в зависимости от его строения выделяют три типа вируса: А, В, С). Структуру этих родоспецифических антигенов определяют посредством ИФА, РСК и др. Поверхностные антигены (гемагглютинин и нейраминидаза) являются протективными. Их структуру, которая определяет подтипы и варианты вируса гриппа, исследуют в РТГА, ИФА и др.

Структура поверхностных антигенов вирусов гриппа А постоянно изменяется, причем изменения НА- и NA-антигенов происходят независимо друг от друга. В настоящее время известно 15 подтипов гемагглютинаина и 9 подтипов нейраминидазы, но от человека стабильно выделяются только Н1, Н2, Н3 и N1, N2.

Необычайная изменчивость вирусов гриппа А объясняется двумя процессами, которые получили названия антигенный дрейф и антигенный шифт:

антигенный дрейф — это незначительные изменения структуры поверхностных антигенов, которые происходят достаточно часто и обусловлены точечными мутациями в тех сайтах генома, которые отвечают за

синтез и структуру антигенных детерминант гемагглютинина и нейраминидазы.

В результате в популяции вирусов постоянно появляются новые сероварианты, которые незначительно отличаются от исходного штамма. Новые варианты обуславливают периодические эпидемии гриппа, потому что через 2–3 года циркуляции любого штамма среди людей структура поверхностных протективных антигенов настолько изменяется, что выработанный ранее иммунитет лишь частично защищает от заболевания. Так коллективный иммунитет становится фактором отбора новых антигенных вариантов;

антигенный шифт-это значительные изменения структуры поверхностных антигенов вируса гриппа А, которые обусловлены пересортировкой и полной заменой гена, кодирующего гемагглютинин или нейраминидазу определенной разновидности.

Шифт происходит редко и обычно является результатом рекомбинаций, происходящих при попадании в одну клетку двух разных подтипов вирусов. В результате шифта полностью заменяется структура антигена и образуется новый подтип вируса, который становится причиной пандемии. Считается, что источником новых подтипов могут быть вирусы гриппа животных.

Резистентность. В окружающей среде устойчивость вирусов-средняя.

Вирусы гриппа чувствительны:

- к высоким температурам (более 60 С)
- УФ-облучению
- жирорастворителям
- табельным дезифенктантам

Но могут некоторое время сохраняться при низких температурах - в течение недели не погибают при температуре около 4 С.

Эпидемиология. Грипп — антропоноз. Основной механизм передачи — аэрогенный, путь — воздушно-капельный (при кашле, чихании, разговоре). Также возможна контактная передача (при переносе вирусов через инфицированные руки или предметы на слизистую носа или конъюнктиву). Грипп — высококонтагиозное заболевание и часто протекает в виде эпидемий и даже пандемий.

Люди очень восприимчивы к вирусам гриппа. Развитие эпидемии регулируется формированием среди людей иммунной прослойки, т.е. постепенным увеличением числа переболевших и, следовательно, защищенных от данной разновидности вируса. Чаще и тяжелее болеют дети как не имеющие стойкого противогриппозного иммунитета. Но смертность выше среди взрослых, особенно из группы риска (пожилые люди, а также пациенты с ослабленной резистентностью и др.). Вспышки инфекции легко возникают в замкнутых коллективах.



Наибольшее эпидемиологическое значение имеют вирусы гриппа А, так как они поражают не только человека, но и животных (в том числе птиц) и вызывают не только эпидемии, но и пандемии с высокой смертностью.

Однако несмотря на создание профилактических средств, грипп относят к числу неуправляемых инфекций, поэтому так важна созданная ВОЗ программа глобального эпиднадзора за гриппом, в которой участвует и Россия.

Патогенез. В основном входные ворота инфекции — это верхние дыхательные пути, но вирус может проникнуть сразу в альвеолы, что вызывает развитие первичной острой пневмонии. У пациентов из групп высокого риска именно она — частая причина смерти. Первичная репродукция вирусов происходит в клетках эпителия респираторного тракта. Инфицированные клетки начинают вырабатывать интерферон, обладающий неспецифическим противовирусным действием. Развиваются воспаление, отек, набухание базальной мембраны и происходит десквамация клеток поверхностного эпителия. Через поврежденные эпителиальные барьеры вирус гриппа А проникает в кровоток и вызывает виремию. Всасывание продуктов распада клеток также оказывает токсическое и сенсибилизирующее действие на организм. Вирус активирует систему протеолиза и повреждает эндотелий капилляров. Это повышает проницаемость сосудов и серозных оболочек, что вызывает геморрагии и нарушение гемодинамики с расстройствами микроциркуляции. При гриппе также развивается транзиторный вторичный иммунодефицит, что предрасполагает к вторичным бактериальным инфекциям.

Клиника. *Инкубационный период* длится 1–2 дня. Клинические проявления сохраняются 3–7 дней. Реконвалесценция 7–10 дней.

При гриппе А начало болезни острое, у больного обычно наблюдается интоксикация (высокая лихорадка с ознобом, суставные и мышечные боли, сильная головная боль). Вирус гриппа А — нейротропен, поэтому возможно развитие нейротоксикоза, в результате чего может наступить смерть (чаще у детей). Развивается катар верхних дыхательных путей («саднящий» сухой кашель, боли за грудиной, нарушение фонации, ринит и ринорея). Характерен геморрагический синдром — кровоизлияния в кожу, серозные и слизистые оболочки и внутренние органы, повышенная кровоточивость. Опасное осложнение — геморрагическая пневмония и отек легких. Редко и чаще у детей бывает абдоминальный синдром (боли в животе, тошнота, рвота, диарея).

Осложнения при гриппе проявляются в виде бактериальной суперинфекции, обычно вызванной пневмококками или золотистым стафилококком. Грипп А также может осложняться нарушениями функций нервной, сердечно-сосудистой систем, печени и почек и др. Грипп В, как правило, протекает легче, чем грипп А, и может сопровождаться такими



симптомами, как конъюнктивит, глазная боль, или фотофобия. Кроме того, вирус типа В не обладает нейротропностью. Грипп, вызванный вирусами типа С, протекает легко.

Иммунитет. Во время заболевания в противовирусном ответе участвуют факторы врожденного иммунитета, α -интерферон, специфические IgA в секретах респираторного тракта, которые обеспечивают местный иммунитет. Протективные вируснейтрализующие штаммоспецифические сывороточные антитела достигают максимального уровня через 2–3 нед. В ходе реконвалесценции важна роль клеточного иммунитета (NK-клетки и специфические цитотоксические Т-лимфоциты). Постинфекционный иммунитет достаточно длителен и прочен, но высокоспецифичен.

Микробиологическая диагностика. Диагноз «грипп» базируется на:

- 1) выделении и идентификации вируса;
- 2) определении вирусных антигенов и/или вирусной РНК в инфицированных клетках;
- 3) поиске вирусоспецифических антител в сыворотке больного.

Материал для исследования — носоглоточное отделяемое, которое берут тампонами или отсасывают с задней стенки глотки и носа в первые три дня болезни. Иногда исследуют мазки-отпечатки со слизистой носа. Для определения антител исследуют парные сыворотки крови больного.

Экспресс-диагностика. Обнаруживают вирусные антигены в исследуемом материале посредством РИФ (прямой и непрямой варианты) и ИФА. Можно обнаружить в материале РНК вирусов при помощи ПЦР с обратной транскрипцией.

Вирусологический метод. Культивировать вирусы гриппа можно в курином эмбрионе, в культуре клеток (первичная культура клеток почек обезьян и т.п.) и в организме лабораторных животных.

Индикацию вирусов проводят в зависимости от лабораторной модели (по гибели, по клиническим и патоморфологическим изменениям, ЦПЭ, образованию «бляшек», «цветной пробе», РГА и гемадсорбции). Идентифицируют вирусы по антигенной структуре. Применяют РСК, РТГА, ИФА, РБН вирусов и др.

Серологический метод. Диагноз ставят при четырехкратном увеличении титра антител в парных сыворотках от больного, полученных с интервалом 10–14 дней. Применяют РТГА, РСК, ИФА, РН вирусов. Метод чаще используют для ретроспективной диагностики.

Лечение. В большинстве случаев течение гриппа доброкачественное и требует только симптоматического/патогенетического лечения (применяют жаропонижающие, сосудосуживающие, антигистаминные препараты, витамины, детоксикацию, иммуномодуляторы, ангиопротекторы, ингибиторы протеолиза и т.д.). Неспецифически угнетает размножение вирусов α -



интерферон, препараты которого применяют интраназально. Можно применять индукторы эндогенного интерферона. Для этиотропного лечения используют различные противовирусные химиотерапевтические препараты, эффективность которых проявляется в первые 48 ч от начала заболевания. Ремантадин препятствует только репродукции вирусов гриппа А, блокируя ионные каналы белка М2 и изменение рН лизосом клетки-хозяина. Арбидол - препарат, который действует на вирусы гриппа типов А и В, нетоксичен, является иммуномодулятором и индуктором эндогенного интерферона. Ингибиторы нейраминидазы (например, озельтамивир и др.) связываются со стабильными (консервативными) участками нейраминидазы, одинаковыми у вируса гриппа всех типов. При тяжелых формах гриппа можно применять также противогриппозный донорский иммуноглобулин и нормальный иммуноглобулин человека для внутривенного введения. Если присоединяется бактериальная инфекция, назначают антибиотики.

Профилактика. Для неспецифической профилактики гриппа показаны противоэпидемические мероприятия, ограничивающие распространение вирусов гриппа аэрогенно и контактно (изоляция больных, карантин в детских коллективах и лечебных учреждениях, дезинфекция белья и посуды, ношение марлевой повязки, тщательное мытье рук). Большое значение имеет повышение общей сопротивляемости организма. Для неспецифической противовирусной профилактики применяют интраназально препараты α -интерферона и оксолина (интраназально 2 раза в день 0,25% мазь в течение 25 дней во время эпидемии гриппа). Для экстренной химиофилактики во время эпидемии гриппа можно применять ингибиторы нейраминидазы, а также арбидол и ремантадин (в течение не менее 2–3 нед.). Следует помнить, что действие ремантадина ограничено типом вируса, а также то, что он может вызвать побочные эффекты (возбуждение ЦНС, желудочно-кишечные расстройства).

Специфическая плановая профилактика заключается в вакцинации. Вакцинирование проводят не менее чем за месяц до начала эпидемического сезона (октябрь–ноябрь). Оно рекомендовано прежде всего лицам из группы высокого риска, персоналу лечебных учреждений и т.п. Для поддержания напряженного иммунитета требуется ежегодная ревакцинация. Разработано несколько разновидностей вакцин для профилактики гриппа А и В, приготовленных на основе штаммов, прогностически актуальных в данный эпидемиологический сезон. Вакцинные штаммы обновляются раз в 2–3 года. В России разрешены к применению следующие вакцины:

- живые аллантоисные (интраназальная)
- инактивированные цельновирионные (парентеральная-подкожная)
- химические (в том числе полимер-субъединичная)
- сплит-вакцины

Живые вакцины создают наиболее полноценный, в том числе местный, иммунитет. Однако они, а также инактивированные цельновирионные



вакцины могут вызывать аллергию у лиц с повышенной чувствительностью к куриному белку (так как вирусы культивируют и выделяют из куриных эмбрионов). Сплит-вакцины, т.е. высокоочищенные «расщепленные», содержат полный набор вирусных антигенов, но из них удалены липиды липопротеиновой оболочки, чтобы уменьшить пирогенный эффект.

Субвирионные («химические») вакцины содержат только протективные антигены (НА и NA). Современные субъединичные вакцины нового поколения обладают также иммуномодулирующим действием за счет полимеров-адъювантов.

Пассивная иммунопрофилактика гриппа возможна в очагах инфекции. Для ее целей могут использовать противогриппозный гамма-глобулин, противогриппозную сыворотку типа А1, А2, В с сульфаниламидами (вводят в носовые ходы, чтобы местно создать высокий титр антител). Пассивная иммунопрофилактика донорским иммуноглобулином назначается контактным лицам не позднее 7-го дня.

