

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет»**

**Факультет естественных наук**

**Т.Н. Ильичева, С.В. Нетесов, В.Н. Гуреев**

**ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ**

**«Вирусы гриппа»**

**Методическое пособие**

**Часть I**

**Новосибирск**

**2012**

Методическое пособие ориентировано на студентов III курса факультета естественных наук и медицинского факультета, специальность микробиология и вирусология. Методическое пособие состоит из двух частей. Часть I содержит современные представления о строении и репродукции вирусов гриппа, эпидемиологии и иммунопатогенезе гриппозной инфекции. Часть II содержит подробные протоколы основных методов исследования вирусов гриппа: культивирования вирусов в культурах клеток и куриных эмбрионах, серологических методов тестирования вирусов, исследования чувствительности вирусов к противовирусным препаратам, проведения молекулярно-генетических исследований.

Составители

Ильичева Т.Н., Нетесов С.В., Гуреев В.Н.

Методическое пособие разработано в рамках реализации Программы развития НИУ-НГУ при поддержке гранта ФЦП ГК № 14.740.11.0247 и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущей научной школы НШ-2996.2012.4.

© Новосибирский государственный университет, 2012

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1.1. Первые исторически зафиксированные эпидемии гриппа.....	7
1.2. Пандемия гриппа 1918 – 1920-х гг. («испанка») .....	8
1.3. Пандемия Азиатского гриппа (1957 – 1959 гг.).....	11
1.4. Пандемия Гонконгского гриппа (1968 – 1970 гг.).....	12
1.5. Пандемия так называемого «русского гриппа» (1977 – 1978 гг.).....	12
1.6. Первая пандемия гриппа в XXI в. ....	13
1.7. Вирусы гриппа с пандемическим потенциалом .....	14
1.8. История открытия вируса гриппа.....	16
ГЛАВА 2. СТРУКТУРА ВИРИОНА ВИРУСА ГРИППА .....	20
2.1. РНК-геном и белки вируса гриппа.....	21
2.2. Вирусы гриппа А, В и С .....	23
2.3. Поверхностные гликопротеины вируса гриппа.....	24
ГЛАВА 3. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ВИРУСА ГРИППА .....	28
3.1. Прикрепление вируса к клетке.....	28
3.2. Проникновение вирусных РНК в клетку .....	33
3.3. Расщепление НА – необходимое условие инфекционности вируса.....	35
3.4. Синтез вирусных белков.....	37
3.5. Синтез РНК вируса гриппа.....	39
3.6. Сборка вирусной частицы .....	41
3.7. Сборка в вирионе сегментированного РНК-генома .....	43
3.8. Реассортация вирусных геномов.....	45
ГЛАВА 4. ПАТОГЕНЕЗ.....	48
4.1. Передача вируса гриппа .....	48
4.2. Сезонность гриппа .....	50
4.3. Врожденный иммунитет.....	52
4.4. Воспалительная реакция.....	54
4.5. Адаптивная иммунная защита.....	57

4.5.1. Антитела в системе адаптивной иммунной защиты.....	59
4.6. Нейтрализация вируса антителами .....	60
ГЛАВА 5. ПРОФИЛАКТИКА ГРИППА (Совместно с А.А. Романовской).....	63
5.1. Препараты адамантанового ряда.....	65
5.2. Ингибиторы нейраминидазы .....	66
5.3. Арбидол.....	68
5.4. Рибавирин .....	69
5.5. Лекарственная устойчивость штаммов вируса гриппа .....	70
5.6. Комбинированная терапия .....	72
ГЛАВА 6. РАЗМНОЖЕНИЕ И ТИТРОВАНИЕ.....	75
6.1. Выращивание вируса гриппа в куриных эмбрионах .....	75
6.2. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА).....	76
6.3. Микронеutralизация вируса гриппа .....	78
6.4. Титрование вирусов: метод получения бляшек.....	81
6.5. Титрование вирусов методом предельных разведений.....	84
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	86

## ВВЕДЕНИЕ

Семейство Orthomyxoviridae (от греч. *orthos* – прямой, *myxa* – слизь) представляет собой семейство РНК-содержащих вирусов, которое, согласно последней версии таксономии вирусов, включает пять родов: род гриппа А, гриппа В, гриппа С, Isavirus и Thogotovirus. Первые три рода состоят из вирусов, вызывающих грипп у позвоночных животных, включая птиц, людей и других млекопитающих. Isaviruses являются патогенами лосося, а Thogotoviruses вызывают заболевания у позвоночных и беспозвоночных животных, таких как комары и морские вши. Три рода вируса гриппа идентифицируют по антигенным различиям в нуклеопротеидном и матриксном белках. Вирусы рода Influenza virus А были причиной всех пандемий гриппа; они инфицируют людей, других млекопитающих и птиц. Штаммы рода Influenza virus В инфицируют людей и тюленей, а штаммы Influenza virus С инфицируют людей и свиней.

В современной системе обозначений штаммов вирусов гриппа человека, предложенной Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 1980 г., принято указывать род, географический регион, где был выделен вирус, номер штамма и год его выделения, а в случае вирусов гриппа А – субтип вируса, т. е. характеристику его поверхностных антигенов – гемагглютинина (Н) и нейраминидазы (N). Например, обозначение А/Москва/10/99/Н3N2 означает, что это вирус рода Influenza virus А, обнаружен в Москве, номер штамма 10, выделен в 1999 г., субтип Н3N2, т. е. имеет гемагглютинин Н3 и нейраминидазу N2.

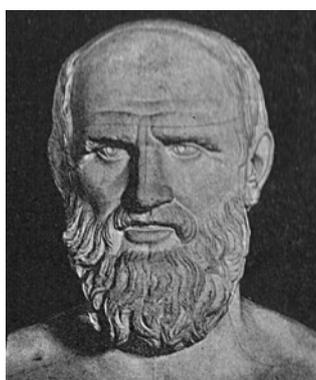
По степени патогенности все микроорганизмы, в том числе и вирусы, подразделяются на четыре группы. Согласно российской классификации, первая группа – это наиболее опасные для человека вирусы и бактерии, четвертая группа – наименее опасные и условно-патогенные микроорганизмы. В рамках этой классификации вирусы гриппа А, В и С относят к третьей группе патогенности, а аттенуированные и вакцинные штаммы вируса гриппа – к четвертой группе. В связи с этим все работы с вирусом гриппа должны проводиться толь-

ко в боксовых помещениях, аттестованных для работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности.

# ГЛАВА 1. ПАНДЕМИИ ГРИППА

## 1.1. Первые исторически зафиксированные эпидемии гриппа

Считается, что первая эпидемия гриппа была описана Гиппократом в V в. до н. э. в шестой книге «Эпидемия», где он сообщал, что заразная болезнь свирепствовала на севере Греции, во Фракии. Больные, как он указывал, жаловались на боли в ногах, частый кашель, ангину и кишечные расстройства. У Тита Ливия есть указания на сходную эпидемию в 412 г. Однако по недостаточным описаниям трудно установить природу этих болезней.



**Рис. 1.** Гиппократ, автор первого зафиксированного описания гриппоподобного заболевания.

Наиболее достоверный перечень эпидемий прослеживается по историческим источникам начиная с 1500 г. Пандемии и эпидемии, вызванные, по всей видимости, вирусами гриппа и сопровождавшиеся большой смертностью населения, перечислены в табл. 1.

**Таблица 1.** Пандемии и эпидемии XVI – XIX столетий, которые, по восприятию современников, сопровождались большой смертностью населения\*.

Годы	Масштабы	Клинические особенности
1580	Европа, Североамериканский континент, Африка, Восточные страны	Подробностей нет, но отдельные вспышки по смертности сравнивали с чумой.
1626	Италия, южная часть Франции	То же.
1729 – 1730	Европа, Россия	По смертности сравнивали с чумой. Наиболее тяжело болезнь протекала в Италии, Соединенном Королевстве (Лондон), Испании и Франции (Париж). Респираторные и геморрагические явления, нарушения гемодинамики, симптомы поражения ЦНС. В Англии наблюдали петехи-

		альные сыпи.
1836 – 1837	Австралия, о. Ява, Индия, южная Африка, Европа, Россия	По смертности сравнивали с холерой (эпидемии чумы в Европе уже прекратились и были забыты). Наиболее тяжелое течение болезни отмечалось в Западной Европе. Пневмонии, поражения ЦНС, выраженные геморрагические явления, воспаления глаз, сыпи.
1843	Север Сибири (район не указан)	Очень тяжелое течение болезни среди местного населения Севера. Основные поражения – в легких и ЦНС.
1858 – 1859	Сибирь (район Иркутска)	Тяжелое течение болезни у бурят. Основные поражения – в легких и ЦНС, геморрагические явления, нарушения гемодинамики, отеки, поражения печени, органов слуха.
1889 – 1892	Китай, Россия, Европа, Северная Америка, Африка, Австралия	Слабость и угнетенность, боль в глазных яблоках и в мышцах. В тяжелых случаях часто развивались бронхиты и пневмонии, но общая смертность была незначительна. По данным серологической археологии, пандемия 1889 – 1892 гг. была вызвана вирусом серотипа H2N2.

\* По данным Г. Гезера (1867), Н. А. Протасова (1891), Г. Ф. Вогралика (1935), Н.Ф. Гамалеи (1942).

## 1.2. Пандемия гриппа 1918 – 1920-х гг. («испанка»)

После пандемии 1889 – 1892 гг. и даже до конца Первой мировой войны пандемий острых респираторных заболеваний практически не было. Новая пандемия, названная «испанской болезнью», или «испанкой», началась уже в конце войны – в 1918 г. Место ее появления точно установить пока невозможно, но, как сейчас ясно, во всяком случае не Испания была первичным эпидемическим очагом. Название «испанка» появилось случайно: так как военная цензура обеих воюющих сторон не допускала сообщений о начавшейся в армии и среди населения эпидемии, то первые известия о ней появились в печати в мае – июне 1918 г. в нейтральной Испании.

**Первая волна пандемии.** По одной из версий, распространение вируса «испанки» началось из Форта-Райли (Канзас, США) в январе – феврале 1918 г., и, по всей видимости, оттуда американские солдаты перенесли болезнь в Европу. В то же время в 1917 г. появилось много случаев гнойного бронхита среди

английских солдат, сначала на Британских островах, потом во Франции. В континентальной Европе первые случаи заболевания «испанкой» были выявлены среди американских солдат в окрестностях Бреста и Бордо. Позже грипп начал появляться в английской армии, откуда с возвращающимися домой солдатами был перенесен в Англию.

Другие исследователи считают, что болезнь была завезена в Европу из Азии либо китайскими трудовыми батальонами, которые высадились на побережье Франции, либо русскими солдатами, прибывшими из Владивостока. Истинный источник эпидемии сегодня не известен.

Каковы бы ни были причины появления «испанки», но эпидемический характер она сначала приобрела во Франции. По своей клинической картине болезнь в некоторых группах населения напоминала легочную чуму. Последнее обстоятельство в связи с легкостью заражения, быстрым и массовым распространением по Западной Европе, с одной стороны, и внезапным началом и бурным течением с частыми летальными исходами – с другой, обратило на себя всеобщее внимание и создало у современников взгляд на эту болезнь как на какое-то совершенно новое эпидемическое явление.

В конце апреля 1918 г. эпидемия охватила Париж. Одновременно она вспыхнула в Италии. В мае заболевание распространилось по Испании, Швейцарии, Португалии, Италии, Сербии, Греции. В июне – по Англии, Румынии, Швеции и Германии. В июле – по Дании, Голландии, Бельгии, Скандинавским странам и Польше.

Еще в мае «испанка» появилась в северной Африке, а в июне – в Индии (Бомбей, Калькутта, Мадрас). Этим временно закончилось дальнейшее развитие эпидемии. Число случаев болезни, достигавшее довольно крупных цифр при малой смертности, стало убывать. В августе количество заболевших резко снизилось, что было принято за конец пандемии.

**Вторая волна пандемии.** После нескольких месяцев затишья подошла вторая волна пандемии, во время которой заболеваемость была ниже, но смертность выше. Сначала болезнь появилась на западном побережье Африки в

Сьерра-Леоне в конце августа 1918 г., откуда болезнь распространилась на все западное побережье Африки.

В Северной Америке вторая волна началась в октябре 1918 г. в Бостоне, куда, как тогда считали, ее занесли возвратившиеся из Европы солдаты.

Первые случаи гриппа второй волны в Польше появились в середине сентября в Кракове, в октябре – в Варшаве и Сосновце, затем в течение короткого времени эпидемия охватила всю Польшу. Еще более катастрофические размеры вторая волна пандемии «испанки» приняла в Индии, где число смертей ориентировочно оценивали в 5 млн случаев. Наблюдались случаи поголовного вымирания ряда деревень; мертвых не было возможности хоронить, поля оставались неубранными.

К концу второй волны из населенных мест остались незатронутыми лишь Мадагаскар, Австралия и Новая Каледония, как тогда считали, благодаря рациональным и строго проводимым мерам профилактики. Окончанием второй волны считали конец декабря 1918 г.

**Третья волна пандемии.** Она началась в феврале – марте 1919 г. и вновь поразила обширные территории, захватив на этот раз и уцелевшие до сих пор островные колонии. Эта вспышка также отличалась высокой смертностью. Окончилась она в разных местностях не одновременно, растянувшись кое-где до июня и даже до августа. Пандемия прекратилась только в 1920 г. При возможностях диагностики того времени трудно было определить точное количество переболевших людей. По-видимому, болело не меньше 550 млн человек, а погибло, по последним данным, около 50 млн – более 2,5 % всей численности населения планеты того времени, составлявшей 1850 млн. Количество умерших от «испанки» было выше количества погибших на всех фронтах Первой мировой войны.

**Клиническая картина «испанского» гриппа.** Во время пандемии 1918 – 1920 гг. врачам часто приходилось наблюдать чрезвычайно быстро наступающее развитие пневмоний, сопровождающихся обширным поражением легких с большим количеством крови в мокроте, протекавших бурно, с явлениями тяже-

лой общей интоксикации, с быстро нарастающим поражением сердечно-сосудистой системы, резким падением кровяного давления, помрачением сознания и быстро наступающим смертельным исходом.

### **1.3. Пандемия Азиатского гриппа (1957 – 1959 гг.)**

Следующая пандемия началась в 1957 г., когда в некоторых районах Азии почти одновременно было зарегистрировано резкое увеличение гриппоподобных болезней. Пандемия имела две волны (1957 г. и 1959 г.), а в некоторых странах, в том числе и в СССР, эти волны делились еще на две. Первая эпидемическая волна в сравнительно короткий период (1 – 2 месяца) охватила почти все страны Азии. В мае эпидемия проникла в Африку, позднее (в июне – июле) было зафиксировано резкое увеличение гриппоподобных заболеваний в отдельных районах Америки и Австралии. В сентябре и октябре пандемия гриппа широко распространилась в странах Европы и в США. В СССР в марте и апреле 1957 г. регистрировались ограниченные вспышки гриппозных заболеваний в различных географических зонах. Однако основной подъем заболеваемости гриппом H2N2 (тогда его называли А2) начался в Советском Союзе с первой декады мая.

В 1958 г. во всех странах мира хотя и отмечалась повышенная заболеваемость гриппоподобными инфекциями, однако количество заболеваний было значительно ниже, чем в 1957 г.

Иное развитие получила пандемическая волна 1959 г. В отличие от 1957 г. резкое увеличение заболеваемости гриппом началось в странах Среднего и Ближнего Востока в конце декабря 1958 г. и в начале января 1959 г. В феврале – марте 1959 г. был отмечен заметный подъем заболеваемости гриппом в странах Юго-Восточной Азии. В этот период локальные, но крупные вспышки гриппа были зарегистрированы в Индии, Индонезии и Японии. В мае и июне отмечалась высокая заболеваемость гриппом в Австралии, особенно на ее северной территории. В мае эпидемической волной гриппа были охвачены страны Африканского континента. В СССР эпидемия 1959 г. распространилась с

юго-востока и к середине января охватила весь Советский Союз и ряд ближайших стран.

При серологическом и вирусологическом обследовании больных было установлено, что эпидемическая волна 1957 г. имела строго моноэтиологический характер, и более 90 % заболеваний было связано с вирусом гриппа H2N2. Во время пандемической волны 1959 г. в значительном проценте (до 30) наряду с вирусом H2N2 был выделен вирус гриппа В.

#### **1.4. Пандемия Гонконгского гриппа (1968 – 1970 гг.)**

Эта пандемия развивалась тремя волнами (1968, 1969 и 1970 гг.) и была вызвана вирусом гриппа нового серотипа H3N2. Заболевание появилось в Сингапуре в начале августа и к сентябрю уже распространилось на другие сопредельные страны, в частности на Индию и северные территории Австралии, но в большинстве этих районов оно носило клинически легкую форму, хотя распространилось довольно широко. Осенью 1968 г. новый вирус достиг Европы, но и там до начала зимы не было зарегистрировано ни одной большой вспышки. Наиболее опасной была вторая волна пандемии. Во время других обычно не отмечали сколько-нибудь значительного повышения смертности. Третья волна пандемии дала о себе знать в конце 1970 г. Затем эпидемия резко пошла на убыль.

#### **1.5. Пандемия так называемого «русского гриппа» (1977 – 1978 гг.)**

С самого начала этой пандемии в «гонке по континентам» не оказалось лидера. В начале 1978 г. вирусы серотипа H3N2 вызвали эпидемии в Европе, Африке и Азии, а на Американском континенте (США, Канада) обосновался вирус гриппа серотипа H1N1. В марте во всех странах Европы и Северной Америки наступило снижение заболеваемости. Причем в это время во многих странах изолировали одновременно штаммы вирусов гриппа A/H1N1 и A/H3N2. В СССР в осенне-зимний период 1977 – 1978 гг. этиологическая структура гриппа была смешанной. Если в сентябре 1976 – апреле 1977 г. грипп

был вызван двумя типами вируса (А/Н3N2 и В), то в те же месяцы 1977 – 1978 гг. грипп был обусловлен тремя серотипами (А/Н1N1, А/Н3N2 и В).

Первая особенность этой пандемии была выявлена при анализе заболевшего гриппом контингента. Эти данные указывают на то, что подавляющее число заболевших в эпидемию 1977 – 1978 гг. приходилось на людей в возрасте до 20 лет, т. е. на ту часть населения, которая не имела контакта с вирусами гриппа серотипа Н1N1, исчезнувшими из циркуляции более 20 лет тому назад. Напротив, лица старше 30 лет составили только 20 % больных, хотя их доля в общей численности населения превышает 50 %, т. е., учитывая низкую заболеваемость в эту эпидемию вообще, люди зрелого и пожилого возраста, имевшие в прошлом контакт с вирусами гриппа Н1N1, практически не болели.

Второй особенностью пандемии было сравнительно легкое течение болезни. Так, в 57,8 % случаев оно было легким и в 42,2 % – средней тяжести.

### **1.6. Первая пандемия гриппа в XXI в.**

Первая пандемия XXI в. началась, как и прежде, неожиданно, хотя к ней готовились все последнее десятилетие. Дело в том, что эксперты ВОЗ и специалисты-гриппологи ожидали пандемию, вызванную высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1. Однако новым пандемическим вирусом оказался вирус А/Н1N1 свиного происхождения, который первоначально вызвал вспышки заболеваемости в Мексике и США в марте и апреле 2009 г. Вирус распространился по планете с такой быстротой, что 11 июня 2009 г. ВОЗ поднял уровень готовности к пандемии гриппа до фазы 6, официально объявив первую пандемию гриппа в XXI в. К тому времени насчитывалось 30000 подтвержденных случаев заболевания в 74 странах. Менее чем через месяц ВОЗ подтвердила уже более 77000 случаев заболевания.

Ответные меры на вспышку соответствовали уровню науки и технологий начала XXI в. Через несколько дней после первых сообщений из Мексики и США исследователи расшифровали полные геномы нескольких изолятов вируса и разместили последовательности в Интернете на веб-сайтах Глобальной

инициативы по обмену данными о птичьей гриппе и Национального центра биотехнологической информации (США). Почти в реальном времени филогенетики определили комплексное происхождение вируса. В течение нескольких недель был получен вакцинный штамм, и началось производство вакцины.

В 2010 г. заболеваемость пошла на спад, и 10 августа Генеральный секретарь ВОЗ М. Чен объявила об окончании пандемии и наступлении постпандемического периода. Меньше чем за полтора года пандемия затронула 214 стран и территорий мира и стала причиной смерти по меньшей мере 18449 человек. Этот показатель сравним и даже несколько ниже данных о людских потерях при ежегодных эпидемиях гриппа.

В России первый случай заболевания, вызванного пандемическим вирусом гриппа А/Н1N1, был зарегистрирован 18 мая 2009 г. у туриста, вернувшегося из США. Вирус быстро распространился по территории Российской Федерации, и уже в июле появились лабораторно подтвержденные случаи заболевания людей в Екатеринбурге, Томске, Барнауле и Владивостоке. Первые летальные случаи были зарегистрированы в Читинской и граничащей с ней Амурской областях.

С помощью методов молекулярно-генетического анализа было выяснено, что пандемический вирус гриппа А/Н1N1 2009 – это результат генетической рекомбинации вирусов человека и животных, которая, возможно, имела место в организме свиньи, хотя свидетельств прямой передачи этого вируса от свиньи к человеку нет. Тем не менее весьма вероятно, что свинья явилась «смешивающим сосудом» для поколения новых вирусов гриппа А человека.

### **1.7. Вирусы гриппа с пандемическим потенциалом**

Долгое время считалось, что вирусы птичьего гриппа непатогенны для человека. Однако в последние годы наблюдаются человеческие инфекции, вызванные высокопатогенными вирусами гриппа птиц (Highly Pathogenic Avian Influenza – HPAI) H5 и H7, а также низкопатогенными вирусами H9N2. К настоящему моменту ни один из них не адаптировался полностью к человеку.

Однако, поскольку до сих пор в человеческой популяции эти вирусы не циркулировали, люди не имеют специфического иммунитета к этим патогенам, и потому они представляют собой существенную пандемическую угрозу.

Передача вируса НРАІ H5N1-подтипа от птиц к человеку впервые была выявлена во время эпизоотии в 1997 г. в Гонконге, когда 18 человек заболели ОРЗ с симптомами классического гриппа; шестеро из них умерло. Вирус, переданный от зараженных кур, содержал ген НА, происходящий от вируса H5N1-подтипа, впервые выделенного от гуся в 1996 г. Родственные вирусы H5N1-подтипа циркулировали среди птиц в южном Китае с 1997 по 2001 г. без передачи людям. С 2003 г. серьезные вспышки выявлялись во Вьетнаме, Таиланде, Индонезии, Китае и других странах Азии. Генетическое сравнение вновь выявленных штаммов с изолятами 1997 г. показало, что новые вирусы относились к другим генотипам, возникшим в результате множественных рекомбинаций. Всесторонние молекулярно-эпидемиологические исследования показали, что домашние утки и неводоплавающая домашняя птица в южном Китае, возможно, сыграли ключевую роль в создании и поддержании вируса H5N1-подтипа и что дикие птицы могли способствовать широкому распространению вируса. Роль мигрирующих птиц как переносчиков вируса была впоследствии доказана, когда вслед за вспышкой в заповеднике озера Цинхай в северо-западном Китае весной 2005 г. вирус распространился в течение нескольких месяцев по Сибири, Европе и Африке. Однако важную роль в распространении вируса могла сыграть и международная торговля домашней птицей. Заражение человека этим вирусом характеризуется тяжелой пневмонией, сочетающейся с высокой вирусной нагрузкой и гиперцитокинемией.

Хотя прежде и сообщалось о спорадических передачах людям НРАІ H7N7-подтипа, за все время наблюдений была выявлена лишь одна вспышка в 2003 г. среди домашней птицы в Нидерландах, когда наблюдалось и заболевание у человека. Тогда было отмечено 83 случая с относительно мягким течением болезни, похожей на грипп, и конъюнктивитом. Однако в одном из них инфекция человека сопровождалась отеком легких и привела к смерти. Сероземи-

демиологические исследования выявили, что инфицирование людей было значительно шире и что были случаи передачи этого штамма от человека к человеку.

Заражения человека вирусом А/Н9N2-подтипа наблюдались в 1999 и 2003 гг. и приводили к слабым респираторным проявлениям.

### **1.8. История открытия вируса гриппа**

Название «инфлюэнца» в медицинских трудах появилось во время пандемии 1732 – 1738 гг. и, вероятно, происходит от того, что болезнь быстро передается, источник ее как бы «воздействует, влияет» (to influence – влиять, воздействовать) на других находящихся рядом людей, вызывая у них заболевание. Название же «грипп» стали использовать во время следующей пандемии 1742 – 1743 гг. Существует несколько точек зрения на происхождение этого термина. По одной – он происходит от французского названия насекомых (la Grippe), во множестве появившихся в Англии и Франции во время эпидемии и сообщавших, по предположениям, воздуху вредные свойства. По другой – он является производным от французского слова «gripper», что означает «жадно хватать, схватывать».

Кроме этих названий в научной литературе до XIX столетия сохранялись еще и старые названия: catarrus epidemicus, cephalgia contagiosa, febris catarrhalis и др.

Долгое время врачи не могли понять материальную природу гриппа. В Средние века в некоторых странах на этот счет были разные предположения. В Италии, например, считали, что во всем виновато особое расположение звезд и луны. В Германии обратили внимание на то, что болезнь приходит зимой, и предположили, что во всем виноваты моченые яблоки и соленая рыба, основная «зимняя» пища. В XIX в. уже полагали, что заболевание вызывает бактерия, и эта гипотеза получила подтверждение: немецкий врач Ричард Пфайфер во время эпидемии 1889 – 1892 гг. из мокроты больных выделил чрезвычайно мелкую бактерию, похожую на палочку, получившую название *Haemophilus influenzae* –

палочка Пфайфера. Однако во время пандемии гриппа 1918 – 1920 гг. у врачей возникли сомнения в бактериальной природе гриппа. Ведь если болезнь вызывала одна и та же палочка Пфайфера, почему же «испанка» так сильно отличалась от предыдущих эпидемий гриппа?

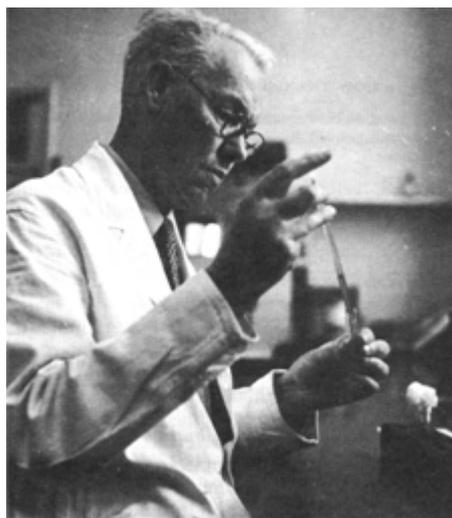
Ответ на этот вопрос был найден только в 1931 г. Американец Ричард Шоуп, изучая грипп у свиней, обнаружил, что респираторная болезнь у свиней вызывается вовсе не бактерией, а вирусом. Логично было предположить, что и человеческий грипп вызывают вирусы. Эта гипотеза ломала все существующие представления о причинах гриппа, и некоторые ученые восприняли ее в штыки. Исследования продолжались, и спустя два года вирус, вызывающий грипп у человека, был открыт учеными Лондонского национального института медицинских исследований Уилсоном Смитом, Кристофером Эндрюсом и Патриком Лейдлоу. История открытия весьма забавна. В 1933 г. в Англии произошла эпидемия гриппа, и ученые, воспользовавшись ситуацией, поставили цель найти животное, чувствительное к человеческому гриппу. Экспериментаторы заражали всех животных, которых сумели раздобыть, включая змей, различных грызунов, мелких хищников, а спустя некоторое время проверяли самочувствие своих подопечных. Однако животные гриппом не болели, и ученые почти отчаялись и уже готовы были сделать вывод, что человеческий грипп животным не передается, как вдруг им повезло. Обходя очередной раз виварий, они обратили внимание, что один из хорьков выглядит нездоровым. Когда сотрудник лаборатории Уилсон Смит взял животное на руки, хорек чихнул. Через два дня Смит сам заболел гриппом, от него и был впервые выделен возбудитель болезни – вирус гриппа типа А.

В 1940 г. Томас Френсис выделяет еще один вирус гриппа – типа В, а в 1947 г. Ричард Тейлор открывает вирус гриппа типа С. В 1955 г. благодаря работам В. Шафер выяснилось, что вирус чумы кур, выделенный еще в 1902 г. Э. Сентани, является вирусом гриппа типа А.

В нашей стране впервые штаммы вируса гриппа А от больных людей были выделены в 1936 г. в Ленинграде А. А. Смородинцевым и в 1937 г. в Москве Л. А. Зильбером.



**Рис. 2.** Ричард Шоуп, первым изолировавший грипп А от свиней в 1931 г.



**Рис. 3.** Кристофер Эндрюс, один из первооткрывателей вируса гриппа А человека (1933 г.).



**Рис. 4.** Анатолий Александрович Смородинцев, выдающийся русский вирусолог, создатель одной из первых вирусологических лабораторий в стране, один из основателей школы отече-

ственных вирусологов. Впервые в мире А. А. Смородинцевым была создана живая аттенуированная вакцина против гриппа. Эта работа была опубликована в 1937 г. в журнале «Lancet». Он был основателем и первым директором Института гриппа МЗ СССР в Ленинграде.



**Рис. 5.** Лев Александрович Зильбер, выдающийся вирусолог и блестящий организатор. Под его руководством была создана Центральная вирусная лаборатория Наркомздрава РСФСР – первое самостоятельное вирусологическое учреждение нашей страны. Его ученики – М. П. Чумаков, А. К. Шубладзе, Е. Н. Левкович, В. Д. Соловьев – стали ведущими вирусологами страны, создали свои научные школы.

#### ***Рекомендуемая литература.***

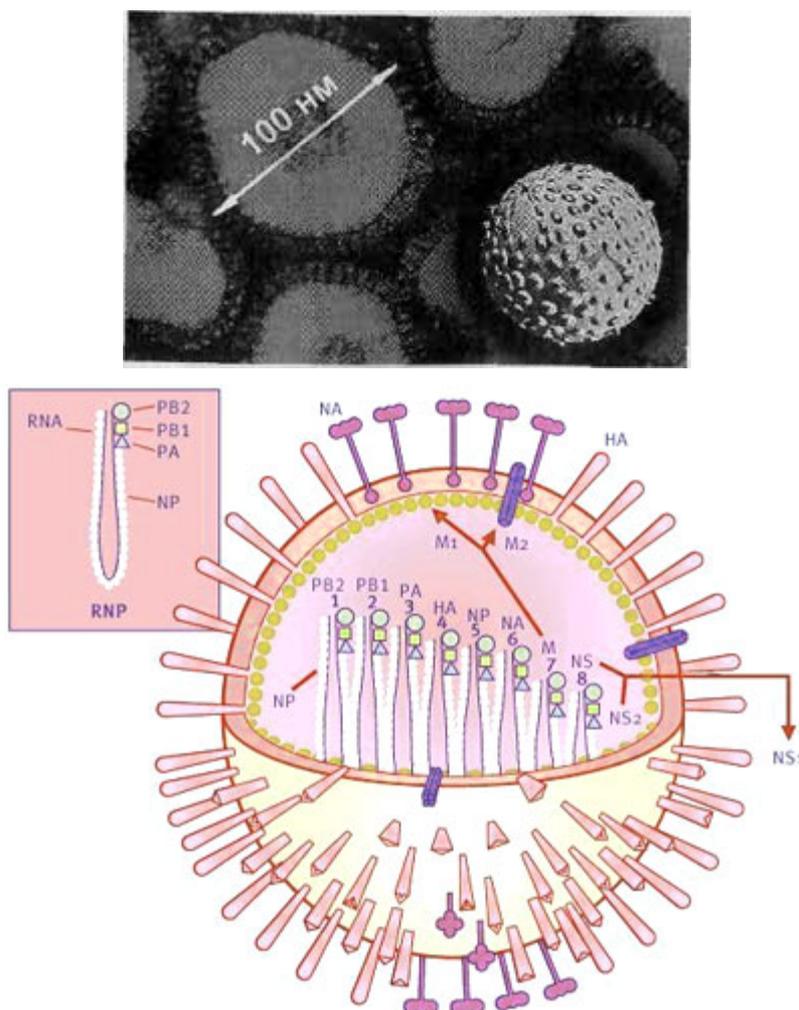
*Morens D. M., Taubenberger J. K., Folkers G. K., Fauci A. S.* Pandemic influenza's 500<sup>th</sup> anniversary // *Clinical Infectious Diseases*. – 2010. – V. 51(12). – P. 1442–1444.

*Neumann G., Kawaoka Y.* The first influenza pandemic of the new millennium // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2011. – V. 5(3). – P. 157–166.

*Taubenberger J. K., Morens D. M.* Influenza: the once and future pandemic // *Public Health Reports*. – 2010. – V. 125, Suppl. 3. – P. 16–26.

*Киселев Л. Л., Абелев Г. И., Киселев Ф. Л.* Лев Зильбер – создатель отечественной школы медицинских вирусологов // *Вестник Российской академии наук*. – 2003. – Т. 73(7). – С. 647–659.

## ГЛАВА 2. СТРУКТУРА ВИРИОНА ВИРУСА ГРИППА



**Рис. 6.** Микрофотография (вверху) и схема строения вируса гриппа А.

Источник фотографии: Нанотехнологии. Наука будущего / В. И. Балабанов. – М.: Эксмо, 2009. – 256 с.

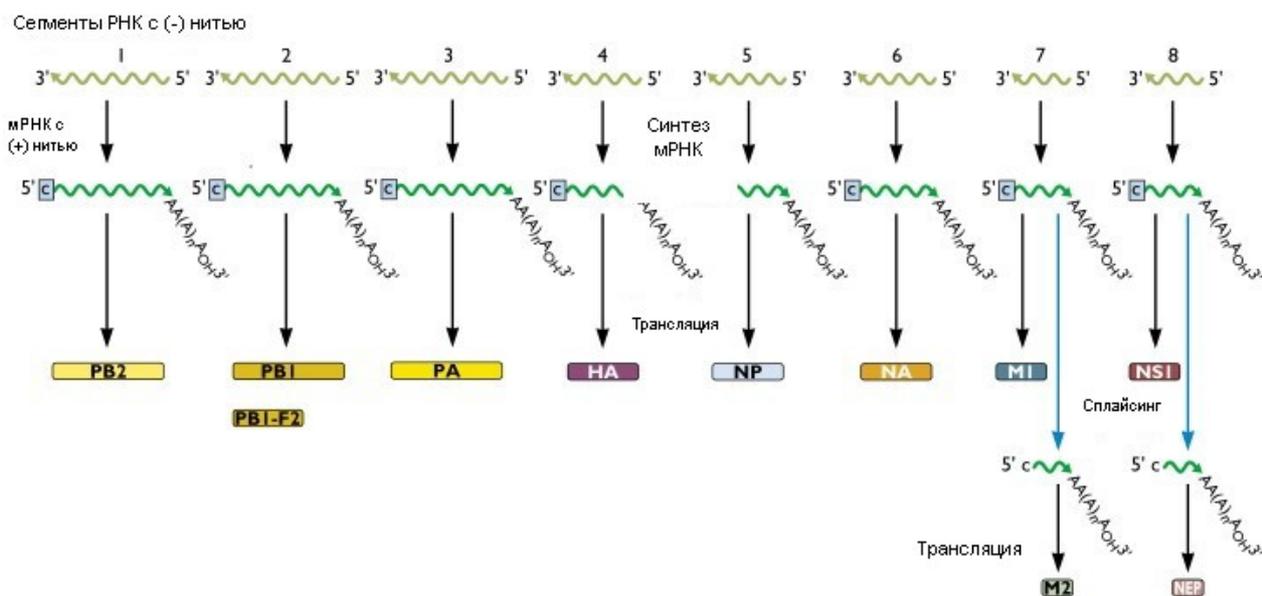
Источник рисунка: Murphy B. R., Webster R. G. (1996) Orthomyxoviruses. In: Fields Virology (Ed. Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M.). – Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. – P. 1353–1445.

Частица вируса гриппа – вирион – имеет форму сферы (рис. 6). Это оболочечный вирус: внешний слой представляет собой липидную мембрану, взятую из клетки хозяина, в которой реплицировался вирус. «Шипы», заякоренные в липидную мембрану, – это гликопротеины гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA). Именно эти белки определяют тип и субтип вируса гриппа (например, A/H1N1). HA и NA играют важную роль в иммунном ответе против вируса; антитела, связывающиеся с этими гликопротеинами, могут защищать от инфекции. Белок NA является мишенью для противовирусных средств Реленза и Тамифлю – ингибиторов нейраминидазы. Тетрамер белка M2, также встроен-

ный в липидную мембрану, является мишенью для противовирусных препаратов на основе адамантана – амантадина и ремантадина.

Под липидной мембраной расположен вирусный, или матриксный, белок М1. Этот белок, заполняющий оболочку вируса, придает ей устойчивость и жесткость. Внутри вириона находятся вирусные РНК: у вирусов гриппа А и В их восемь, у вируса гриппа С – семь. Каждый сегмент РНК кодирует информацию об одном или двух белках. РНК образует комплексы с несколькими белками, показанными на рис. 6: PB1, PB2, PA и NP. Внутренность вириона также включает минорный белок NEP (бывший NS2).

## 2.1. РНК-геном и белки вируса гриппа



**Рис. 7.** Сегменты РНК генома вируса гриппа А и кодируемые ими белки.

Восемь сегментов вирусной РНК несут всю необходимую информацию для образования новых частиц вируса гриппа. На рис. 7 сегменты вирусной РНК обозначены желто-зелеными изогнутыми линиями. В сумме они насчитывают около 14000 нуклеотидов.

Вирусные РНК гриппа являются (-)-цепями РНК, поскольку их РНК не могут непосредственно служить матрицами для синтеза белка. После проникновения в ядро клетки-хозяина минус-нити вирусной РНК гриппа копируются в комплементарные (+) нити (на рис. 7 изображены зеленым цветом). Далее они

транспортируются к рибосомам, и начинается процесс синтеза белка. Вирусные РНК копируются РНК-зависимой РНК-полимеразой, которая привносится в клетку вирусом, поэтому репликативный цикл вируса гриппа не зависит от РНК/ДНК-полимераз клетки-хозяина.

Специфические вирусные белки, кодируемые каждым сегментом вирусной РНК, показаны в нижней части рис. 7 и в табл. 2. Видно, что, например, четвертый сегмент РНК несет информацию о вирусном белке НА, а сегмент 6 – о вирусном белке NA. Некоторые сегменты РНК несут информацию более чем об одном белке (табл. 2).

**Таблица 2.** Полипептиды вируса гриппа А.

Сегмент РНК	Размер (nt)	Полипептид(ы)	Функция
1	2341	<b>PB2</b>	Связывание с 5' кэп-структурой клеточных мРНК.
2	2341	<b>PB1</b>	РНК-зависимая РНК-полимераза.
		<b>PB1-F2</b>	Подавление первичного и специфического иммунного ответа, а также субъединица полимеразы.
3	2233	<b>PA</b>	Эндонуклеаза, расщепляющая клеточные мРНК, экзистированные фрагменты которых затем используются в качестве затравок в синтезе вирусных мРНК.
4	1778	<b>HA</b>	Гемагглютинин: адсорбция, проникновение в клетку и раздевание вируса.
5	1565	<b>NP</b>	Нуклеопротеин: связывание с вирусной РНК (вРНК) в вирионе; часть транскрипционного комплекса; ядерный/цитоплазматический транспорт вРНК.
6	1413	<b>NA</b>	Нейраминидаза: высвобождение вируса – обеспечение его выхода из клетки, а также помощь в проникновении вирусным частицам через секреты слизистых, богатых сиаловой кислотой, для достижения вирионами клеток-мишеней эпителия дыхательных путей).
7	1027	<b>M1</b>	Матриксный белок, заполняет пространство между рибонуклеопротеидом и липидной оболочкой вириона.
		<b>M2</b>	Его тетрамеры образуют ионные каналы.
8	890	<b>NEP</b>	Nuclear Export Protein (NEP), структурный белок вируса гриппа. Ранее назывался NS2-белком и

		считался неструктурным белком вируса гриппа. Опосредует экспорт из ядра клетки вирусных рибонуклеопротеидов (vRNPs).
	<b>NS1</b>	Неструктурный белок, обнаружен в ядре и цитоплазме инфицированных клеток. Образует димер, который ингибирует экспорт полиА-содержащих мРНК из ядра, давая тем самым преференцию вирусным РНК. Сплайсинг, трансляция. Антиинтерфероновая активность.. Кроме того, NS1, возможно, способен подавлять интерфероновый ответ в вирус-инфицированных клетках.

## 2.2. Вирусы гриппа А, В и С

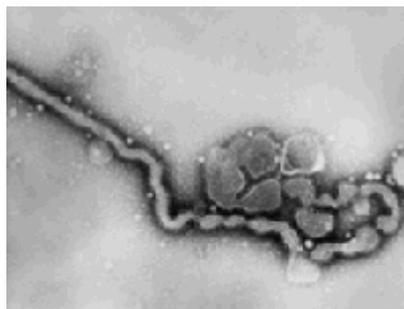
Вирионы гриппа А имеют три мембранно-связанных белка (НА, NA и М2), матриксный белок (М1), расположенный под липидным бислоем, рибонуклеопротеидное ядро, состоящее из 8 сегментов вирусной РНК, белка NP и 3 белков полимеразного комплекса PA, PB1 и PB2, а также белка NEP/NS2. Иногда трудно различить вирусы гриппа А и В средствами электронной микроскопии, однако различия есть. Вирионы гриппа В имеют 4 белка в оболочке: НА, NA, NB и BM2. Так же как и белок М2 вируса гриппа А, BM2 образует протонный канал, важный для обеспечения процесса «раздевания» вируса в клетке. Белок NB также считается образующим ионные каналы, но это не обязательное условие для репликации вируса в клеточной культуре.

Вирусы гриппа В вызывают тот же спектр болезней, что и вирусы гриппа А, однако они не становятся причинами пандемий. Возможно, это объясняется ограниченным кругом хозяев вируса, включающим лишь людей и тюленей, что препятствует появлению новых штаммов при рекомбинации.

Вирусы гриппа С отличны от вирусов гриппа А и В: оболочечные вирионы с шестиугольной структурой на поверхности формируют длинные (500 микрон) напоминающие шнур структуры при отпочковании от клетки (рис. 8). Как и в случае с вирусами гриппа А и В, ядро вируса гриппа С состоит из рибонуклеопротеида, сформированного из вирусной РНК и четырех белков. Белок М1 расположен под мембраной, как и в вирионах гриппа А и В. Оболочечный белок SM2 функционирует как ионный канал. Основной оболочечный

гликопротеин вируса гриппа С называется НЕF (hemagglutinin-esterase-fusion), поскольку он обладает функциями и НА, и NA. Поэтому вирион гриппа содержит семь сегментов РНК, а не восемь, как вирусы гриппа А и В.

Практически все взрослые люди когда-либо заражались вирусом гриппа С, вызывающим мягкое течение респираторной болезни в верхних дыхательных путях. Осложнения с переходом на нижние дыхательные пути – редкость. Вакцины против вируса гриппа С не разработаны.



**Рис. 8.** Вирус гриппа С. Электронная фотография.

Источник: Dr. Linda M. Stannard, 1995, University of Cape Town.

### ***Рекомендуемая литература.***

*Gaur P., Munjhal A., Lal S. K. Influenza virus and cell signaling pathways // Medical Science Monitor. – 2011. – V. 17(6). – P. RA148–154.*

## **2.3. Поверхностные гликопротеины вируса гриппа**

Наиболее важными антигенами вируса гриппа, изменчивость которых и способствует появлению новых эпидемий, являются гемагглютинин и нейраминидаза. Гемагглютинин ответствен за взаимодействие вируса с поверхностью клетки и вызывает индукцию нейтрализующих антител. Фермент нейраминидаза в антигенном отношении полностью отличается от гемагглютинина. Антитела к NA не нейтрализуют инфекционности вируса (кроме очень высоких концентраций), но сильно замедляют освобождение вируса из инфицированных клеток, и эти антитела могут играть важную роль в снижении репликации вируса *in vivo* и в предотвращении распространения инфекции.

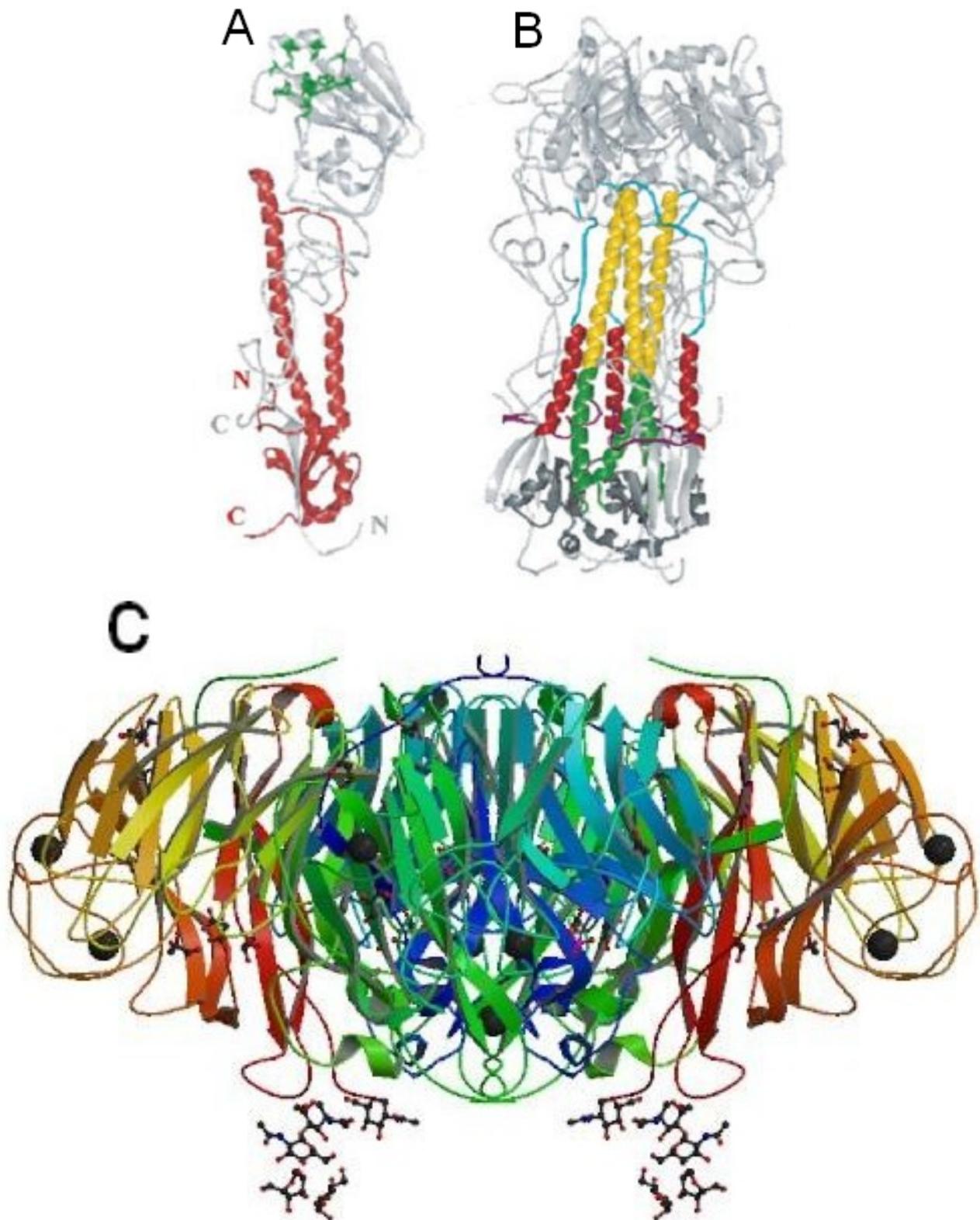
Гемагглютинирующие субъединицы представляют собой гликопротеиновые палочкообразные структуры, треугольные в сечении. Субъединицы НА со-

стоят из двух полипептидов с относительной молекулярной массой около 55000 и 25000. Их обозначают как полипептиды HA1 и HA2. Обе эти цепи синтезируются в виде одного полипептида-предшественника с молекулярной массой около 80000, который в зараженной клетке расщепляется на тяжелый и легкий полипептиды – HA1 и HA2 соответственно. В интактных субъединицах тяжелая и легкая цепи соединены дисульфидными связями, образуя димер, а каждая вирусная субъединица HA, образующая шип на поверхности вириона, состоит из трех таких димеров. Вирусная частица содержит приблизительно 400 субъединиц HA.

Субъединицы HA имеют гидрофобную и гидрофильную части. Гидрофильная часть ответственна за биологическую активность субъединицы, тогда как гидрофобный конец – С-конец легкой полипептидной цепи (HA2) – связан с липидами вирусной оболочки. Нейраминидазная субъединица представляет собой гликопротеиновую структуру с относительной молекулярной массой около 240000. Она состоит из квадратных головок-тетрамеров в форме коробочек, к центру которых прикреплена нить с диффузным хвостом или с небольшой головкой на конце. Выделенные субъединицы обладают полной ферментативной активностью. Каждая вирусная частица содержит примерно 80 субъединиц HA. Однако количество субъединиц HA в вирусной частице может варьировать в зависимости от штамма и типа клетки-хозяина, на которой выращивали вирус.

Субъединицы HA состоят из четырех гликозилированных полипептидов с относительной молекулярной массой около 60000, связанных друг с другом дисульфидными связями. У большинства штаммов эти четыре полипептида идентичны. Однако у некоторых штаммов HA состоит из двух типов полипептидов, слегка различающихся по размерам.

Активный центр фермента и антигенные детерминанты локализованы в различных областях головки субъединицы HA, причем эти головки обладают гидрофильными свойствами. «Хвост» HA гидрофобен и служит для закоривания субъединицы в липидной оболочке вируса.



**Рис. 9.** А – структурная организация полипептидных цепей HA1 (серый) и HA2 (красный) мономера гемагглютинаина вируса гриппа А. Зеленым цветом показан рецептор-связывающий «карман». В – диаграмма трехмерной структуры гемагглютинаина вируса гриппа А. С – структура нейраминидазы вируса H1N1, вызвавшего пандемию в 1918 г. (pdb id 3BEQ).

Источник: *Gamblin S. J., Skehel J. J.* Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V. 285(37). – P. 28403–28409.

***Рекомендуемая литература.***

*Xu R., McBride R., Nycholat C. M., Paulson J. C., Wilson I. A.* Structural characterization of the hemagglutinin receptor specificity from the 2009 H1N1 influenza pandemic // *Journal of Virology*. – 2012. – V. 86(2). – P. 982–990.

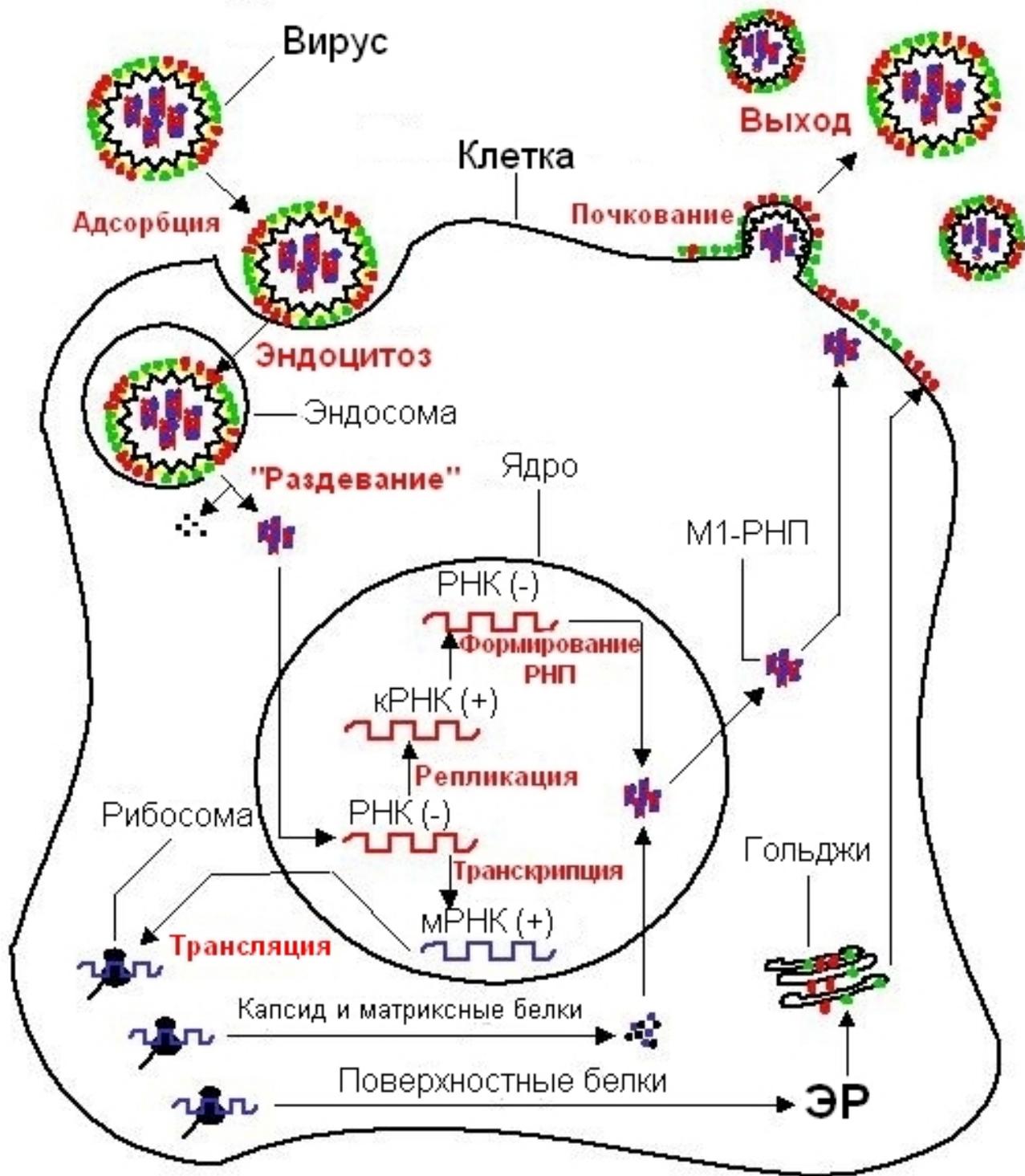
*Yewdell J. W.* Viva la Revolución: Rethinking Influenza A Virus Antigenic Drift // *Current Opinion in Virology*. – 2011. – V. 1(3). – P. 177–183.

## **ГЛАВА 3. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ВИРУСА ГРИППА**

### **3.1. Прикрепление вируса к клетке**

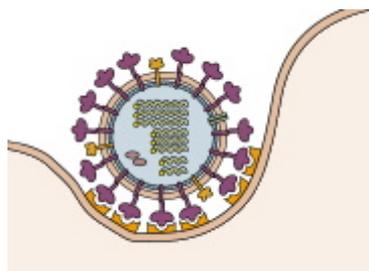
Все события, происходящие в инфицированной вирусом клетке, называются инфекционным циклом, или вирусной репликацией, или жизненным циклом вируса. Стадии включают прикрепление вируса к клетке, проникновение внутрь клетки, синтез белков, репликацию генома, формирование новых частиц и выход частиц из клетки.

Первая стадия – прикрепление вириона к клетке. Вирусы задействуют различные механизмы для прохождения через цитоплазматическую мембрану, но объединяющим для них является то, что вирионы прежде всего должны прикрепиться к рецептору на мембране. На рис. 11 показан вирион гриппа, прикрепляющийся к клеточному рецептору. Для каждого вируса имеется специфический рецептор на поверхности чувствительных клеток, и в свою очередь у вируса есть белок, посредством которого он связывается с клеточным рецептором. У вируса гриппа это белок – гемагглютинин, который взаимодействует с остатками сиаловой кислоты и связанными с ними белками на поверхности эпителиальных клеток.

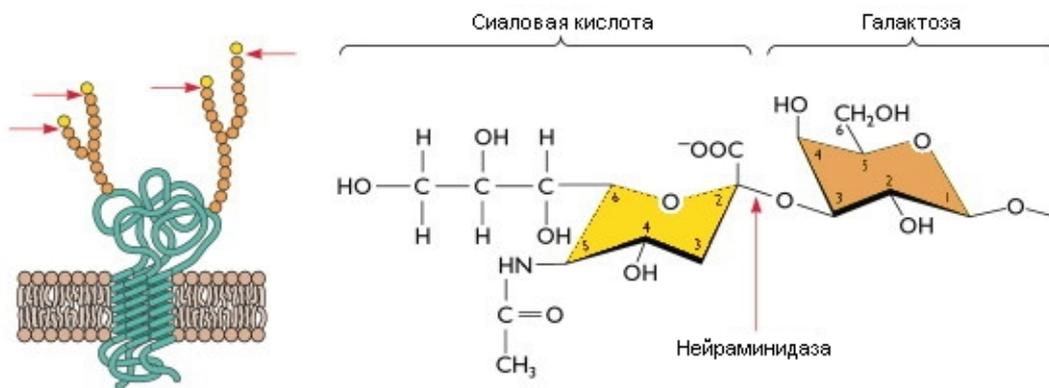


**Рис. 10.** Репликативный цикл вируса гриппа.

Источник: Yury Sidorenko, Max-Planck-Institut, Magdeburg.



**Рис. 11.** Вирион, прикрепляющийся к клетке.



**Рис. 12.** Клеточный гликопротеин в цитоплазматической мембране (слева), химическая структура сиаловой кислоты.

Сиаловая кислота – это N-ацетил-производное нейраминовой кислоты, или проще – аминсахар, прикрепленный ко множеству различных белков на поверхности клетки. На рис. 12 слева показан клеточный гликопротеин. Зеленые нити – это белок, оранжевые кружки – это цепочки остатков сахаров, прикрепленные к белку. Сиаловая кислота всегда является последним остатком в цепочке сахаров, которая прикрепляется к белку. Справа на рис. 12 показана химическая структура сиаловой кислоты; следующий остаток сахара в цепи справа – галактоза.

На рис. 13 изображена молекулярная модель, демонстрирующая, как НА прикрепляется к аналогу сиаловой кислоты. Шаровидный конец НА показан в верхней части рис. 13. Маленькие красные и белые шарики показывают места прикрепления сиаловой кислоты – кармашки на верхнем конце НА.

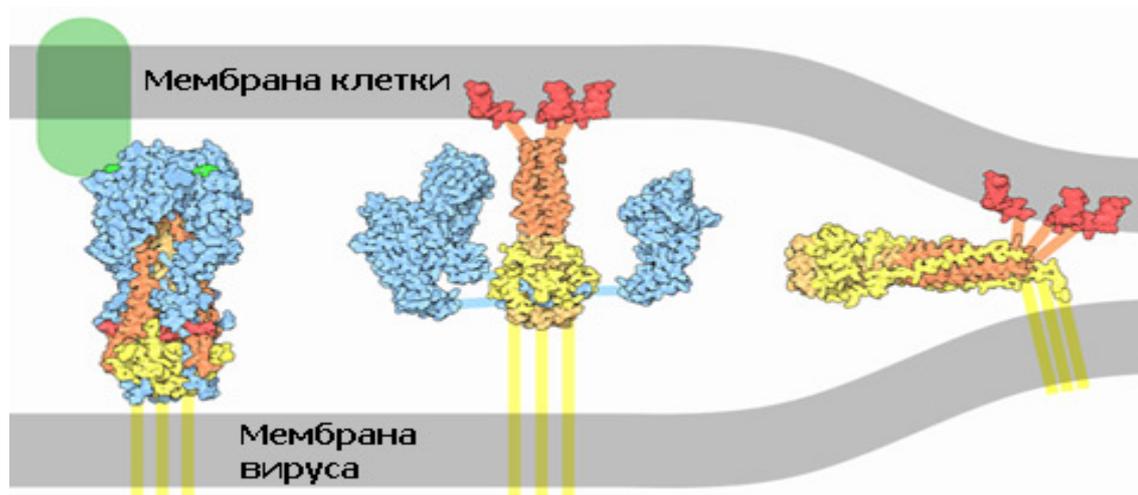


**Рис. 13.** Молекулярная модель взаимодействия гемагглютинина вируса гриппа с сиаловыми кислотами.

Источник: <http://www.en.wikipedia.org>.

На рис. 14 показаны конформационные изменения гемагглютинина в процессе адсорбции вируса на поверхности клетки. Сначала НА связывает сахара (зеленый цвет), затем молекула разворачивается, и с помощью пептида слияния (красный) вирус закрепляется на мембране клетки, после чего связи еще больше укрепляются.

Таким образом, вирион гриппа пристыковывался к поверхности клетки. Он сидит там достаточно прочно, но все еще находится снаружи клетки. Далее ему, а точнее вирусным РНК, необходимо проникнуть внутрь клетки.



**Рис. 14.** Гемагглютинин в действии.

Источник: <http://www.wikimedia.org>.

### **Роль сиаловых кислот**

Существует большое количество химически отличных друг от друга сиаловых кислот, отличающихся радикальными группами, и разные штаммы вируса гриппа имеют сродство к разным молекулам. Эти различия во многом определяют, какой вид животного вирус способен инфицировать.

На рис. 12 (правая часть) видно, что сиаловая кислота связана с галактозой при помощи связи альфа(2,3). Штаммы вируса птичьего гриппа используют в качестве рецептора сиаловые кислоты, прикрепленные к галактозе посредством связи альфа(2,3). Это главная сиаловая кислота на эпителиальных клетках пищеварительного тракта утки. Напротив, штаммы вируса гриппа человека предпочтительно прикрепляются к сиаловым кислотам со связью альфа(2,6). Это основной тип сиаловых кислот, представленных в эпителиальных клетках дыхательного тракта человека. Вместе с тем относительно небольшое количество сиаловых кислот со связью альфа(2,3) находится на реснитчатом эпителии дыхательных путей человека и эпителиальных клетках нижних дыхательных путей.

Рецепторная специфичность имеет критическое значение при заражении человека штаммами вируса птичьего гриппа. Так, высокопатогенные вирусы птичьего гриппа H5N1 в исключительных случаях (например, очень высокая концентрация в аэрозоле) способны инфицировать человека, так как могут раз-

множаться в ограниченном количестве клеток с сиаловыми кислотами со связью альфа(2,3). Однако для эффективной передачи от человека к человеку необходимо, чтобы вирусы распознавали сиаловые кислоты, использующие связь альфа(2,6).

Эпителиальные клетки трахеи свиньи имеют сиаловые кислоты, соединенные с галактозой как связью альфа(2,3), так и связью альфа(2,6). Предполагают, что именно поэтому свиньи могут быть одновременно инфицированы штаммами вируса птичьего гриппа и гриппа человека и служить «смешивающим сосудом», в котором появляются новые вирусы с пандемическим потенциалом. Однако не все исследователи разделяют эту точку зрения.

### ***Рекомендуемая литература.***

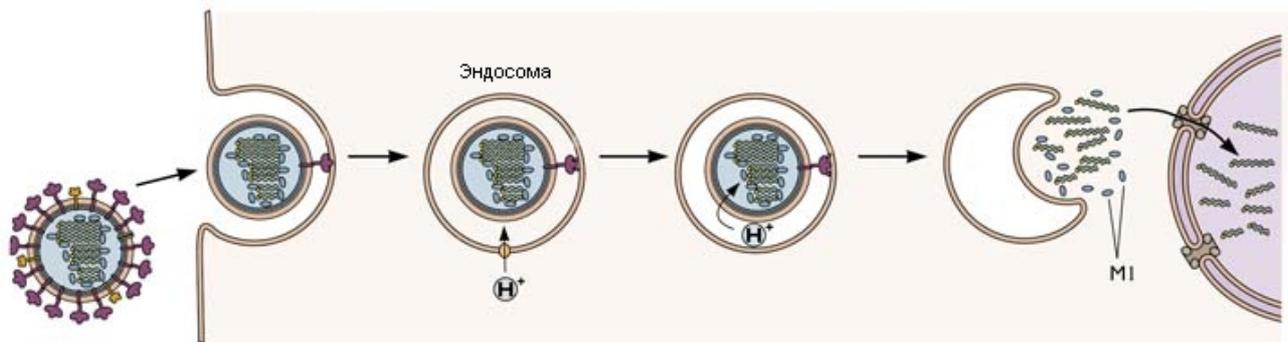
*Fukuzawa K., Omagari K., Nakajima K., Nobusawa E., Tanaka S.* Sialic acid recognition of the pandemic influenza 2009 H1N1 virus: binding mechanism between human receptor and influenza hemagglutinin // *Protein & Peptide Letters.* – 2011. – V. 18(5). – P. 530–539.

*Ge S., Wang Z.* An overview of influenza A virus receptors // *Critical Reviews in Microbiology.* – 2011. – V. 37(2). – P. 157–165. Review.

*Watanabe Y., Ibrahim M. S., Ellakany H. F., Kawashita N., Mizuike R., Hiramatsu H., Sriwilaijaroen N., Takagi T., Suzuki Y., Ikuta K.* Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt // *PLoS Pathogens.* – 2011. – V. 7(5). – e1002068.

### **3.2. Проникновение вирусных РНК в клетку**

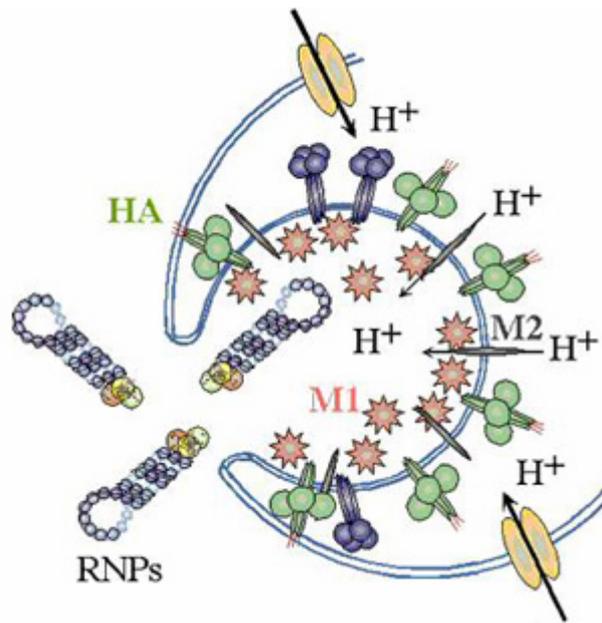
Следующая стадия жизненного цикла вируса – проникновение вирусной генетической информации в клетку; процесс проиллюстрирован на рис. 15.



**Рис. 15.** Проникновение вируса в клетку.

Процесс вхождения вируса гриппа в клетки – наиболее понятный из всех известных механизмов проникновения вирусов. После прикрепления вириона к сиаловой кислоте вирус-рецепторный комплекс входит в клетки посредством эндоцитоза – процесса, в ходе которого клетки обычно получают молекулы из внеклеточной жидкости. Пока эндосомальные везикулы, содержащие частицы вируса, движутся к ядру клетки, рН внутри них понижается благодаря закачиванию протонов ( $H^+$ ) в везикулу. Когда эндосомальный рН достигает 5,0, вирусный белок НА подвергается конформационной перестройке. Это изменение производит пептид слияния – последовательность гидрофобных аминокислот на N-конце НА2 (см. следующую главу), встраиваясь в эндосомальную мембрану, которая в результате этого процесса сливается с вирусной оболочкой. Когда это происходит, вирусные РНК в комплексе с нуклеопротеидным белком выходят в цитоплазму. Затем они транспортируются в ядро клетки, где начинается синтез мРНК.

Вирусные РНК всегда находятся в комплексе с нуклеопротеидным белком, а в вирионе в комплексе с ними находятся и другие вирусные белки, включая белок М1. Пока вирусные РНК связаны с белком М1, они не могут достичь ядра. Для решения этой проблемы вирион гриппа имеет в своей мембране несколько копий белка М2. Этот вирусный белок образует в мембране канал, который активно закачивает протоны из эндосомы во внутреннюю часть вириона. Протоны понижают рН внутри вириона, освобождая вирусные рибонуклеопротеины (РНП) от М1.



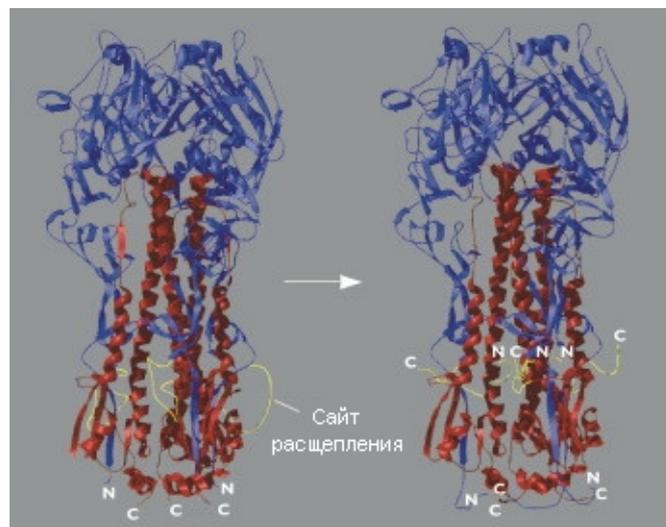
**Рис. 16.** «Раздевание» вируса гриппа и выход рибонуклеопротеидов в цитоплазму.  
 Источник: Paul Digard, Dept Pathology, University of Cambridge.

**Рекомендуемая литература.**

*Eisfeld A. J., Kawakami E., Watanabe T., Neumann G., Kawaoka Y.* RAB11A is essential for transport of the influenza virus genome to the plasma membrane // *Journal of Virology.* – 2011. – V. 85(13). – P. 6117–6126.

**3.3. Расщепление HA – необходимое условие инфекционности вируса**

На вирионе гриппа гемагглютинин располагается в виде тримера из трех копий полипептида HA. Сайт расщепления для клеточных протеаз на белке HA расположен рядом с вирусной мембраной.



**Рис. 17.** Расщепление молекулы гемагглютинина.

На рис. 17 сферический конец белка НА, который прикрепляется к рецепторам клетки, изображен сверху, а вирусная мембрана – снизу. Для наглядности помечен только сайт расщепления НА. Нерасщепленная форма белка обозначается как НА0; после расщепления клеточным ферментом образуются два белка: НА1 (синий) и НА2 (красный). Две субъединицы остаются вместе на поверхности вирусной частицы. Новая N-концевая область НА2, образовавшегося при расщеплении НА0, содержит последовательность гидрофобных аминокислот, называемых пептидом слияния. Во время проникновения вируса гриппа в клетки пептид слияния встраивается в эндосомальную мембрану и способствует слиянию вирусной и клеточной оболочек, благодаря чему вирусные РНК гриппа выходят в цитоплазму. Процесс слияния описан в предыдущей главе.

Если белок НА не расщеплен на НА1 и НА2, то слияния не происходит. Поэтому вирусы гриппа с нерасщепленным НА неинфекционны. Расщепление вирусного НА происходит после того, как вновь синтезированные вирионы выходят из клетки. Вирусы гриппа эффективно размножаются в куриных эмбрионах, поскольку в аллантаической жидкости присутствуют ферменты, способные расщеплять НА. Однако репликация многих штаммов вируса гриппа в культурах клеток требует добавления в среду протеазы (как привило, трипсина).

У людей репликация вируса гриппа ограничена дыхательными путями, поскольку здесь находятся клетки, которые синтезируют трипсиноподобный фермент, расщепляющий молекулу НА. Однако белок НА высокопатогенных штаммов H5 и H7 вируса птичьего гриппа может расщепляться и другими протеазами. В результате эти вирусы способны размножаться во многих органах птиц, включая селезенку, печень, легкие, почки и мозг. Это свойство объясняет способность штаммов H5N1-подтипа вируса гриппа птиц размножаться вне дыхательных путей человека.

#### ***Рекомендуемая литература.***

*Chaipan C., Kobasa D., Bertram S., Glowacka I., Steffen I., Solomon Tsegaye T., Takeda M., Bugge T., Kim S., Park Y., Marzi A., Pohlmann S. Proteolytic activation*

of the 1918 influenza virus hemagglutinin // Journal of Virology. – 2009. – V. 83(7). – P. 3200–3211.

### 3.4. Синтез вирусных белков

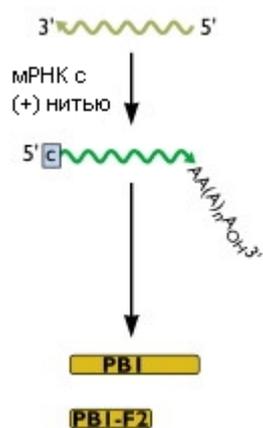


Рис. 18.

На рис. 18 показан сегмент 2 вирусной РНК, несущий информацию о двух белках: PB1 и PB1-F2. Вирусная РНК с (-) нитью копируется в (+) нить мРНК, которая в свою очередь используется в качестве матрицы для синтеза белка. На рис. 19 показана нуклеотидная последовательность первых 180 оснований этой мРНК.

Верхняя строчка – это нуклеотидная последовательность вирусной мРНК. Трансляция обычно начинается с ATG, кодирующего метионин. Следующий триплет, GAT, кодирует аспарагиновую кислоту и т. д. Показаны только первые 60 аминокислот белка PB1; всего белок содержит 758 аминокислотных остатков.

Большая часть вирусных РНК гриппа несет информацию только об одном белке. Однако сегменты 2, 7 и 8 несут информацию о двух белках. В случае с РНК 2 второй белок синтезируется путем трансляции со сдвигом рамки считывания.

Во второй линии последовательности РНК на рис. 19 показан кодон ATG, выделенный красным цветом. Это иницирующий кодон для второго белка, кодируемого РНК 2, а именно для белка PB1-F2 (F2 – значит «рамка 2», так как этот белок образуется из второй открытой рамки считывания). На рис. 20 показано, как образуется PB1-F2. Открытая рамка считывания кодирует белок PB1-F2, который достигает в длину 90 аминокислот (его длина варьирует у различных изолятов). Этот белок намного короче, чем PB1, так как трансляция заканчивается на терминирующем кодоне (TGA) задолго до конца РНК.

```

ATG gat gtc aat ccg act tta ctt ttc ttg aaa gtg cca gcg caa aat gct ata agc aca
M D V N P T L L F L K V P A Q N A I S T
acg ttc cct tat act gga gac cct cct tac agc cat ggg aca gga aca gga tac acc atg
T F P Y T G D P P Y S H G T G T G Y T M
Gat act gtc aac agg aca cat cag tac tca gaa aag gga aga tgg aca aca aac acc gag
D T V N R T H Q Y S E K G R W T T N T E

```

**Рис. 19.** Нуклеотидная последовательность первых 180 оснований мРНК 2 и транслируемая с нее аминокислотная последовательность белка PB1 (первые 60 аминокислотных остатков).

```

ATGgatgtcaatccgacttttacttttcttgaaagtgccagcgcaaaaatgctataagcacacaacgttcccttatactggag
accctccttacagcc
atg gga cag gaa cag gat aca cca tgg ata ctg tca aca gga cac atc agt act cag aaa
M G Q E Q D T P W I L S T G H I S T Q K
agg gaa gat gga caa caa aca ccg aga ctg gag cac cac aac tca acc cga ttg atg gac
R E D G Q Q T P R L E H H N S T R L M D
cac tgc cag aag aca atg aac caa gtg gtt atg ccc aaa cag att gtg tat tgg aag caa
H C Q K T M N Q V V M P K Q I V Y W K Q
tgg ctt tcc ttg agg agt ccc acc ccg gta tct ttg aaa act cgt gtc ttg aaa cga tgg
W L S L R S P T P V S L K T R V L K R W
agg ttg ttc agc aaa cac gag tgg aca agc tga cgc aag gcc gac aga cct atg act gga
R L F S K H E W T S -

```

**Рис. 20.** Вторая рамка считывания на мРНК 2 и транслируемая с нее аминокислотная последовательность белка PB1-F2.

***Рекомендуемая литература.***

*Conenello G. M., Tisoncik J. R., Rosenzweig E., Varga Z. T., Palese P., Katze M. G.*

A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo // *Journal of Virology.* – 2011. – V. 85(2). – P. 652–662.

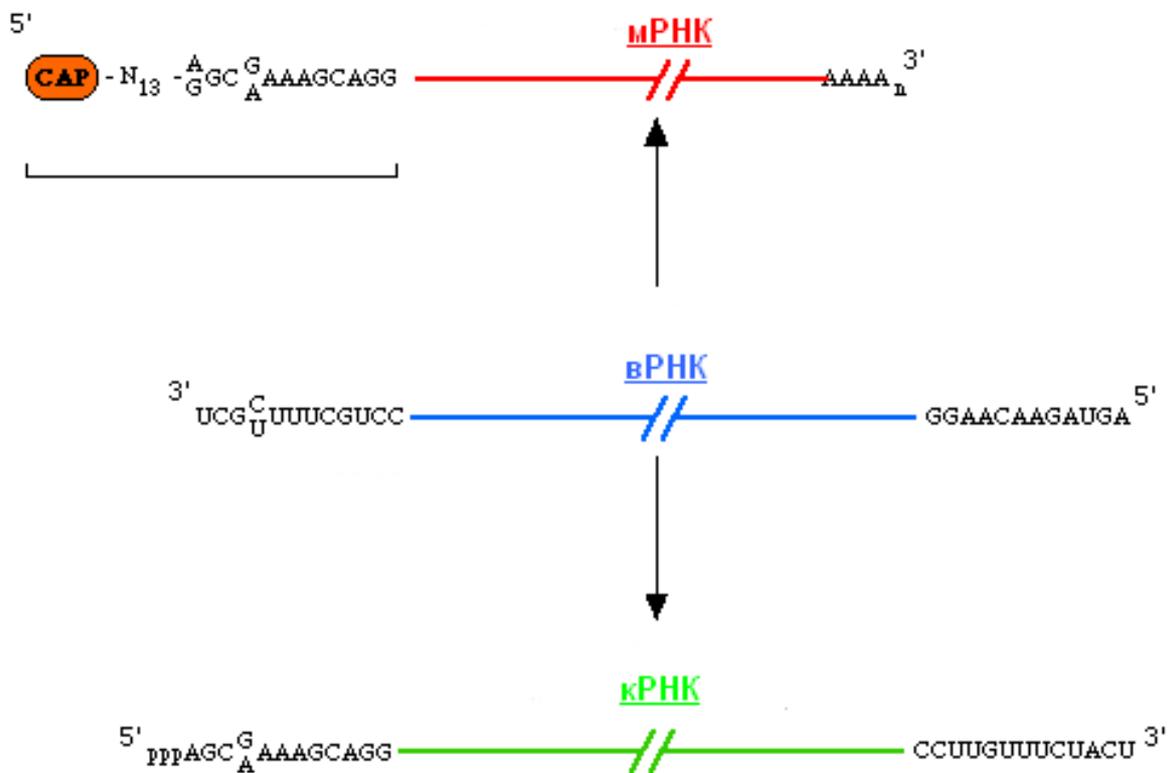
*Trifonov V., Rabadan R.* The Contribution of the PB1-F2 protein to the fitness of Influenza A viruses and its recent evolution in the 2009 Influenza A (H1N1) pandemic virus // *PLoS Currents.* – 2009. – V. 1. – P. RRN1006.

*Yángüez E., Nieto A.* So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell // *Virus Research.* – 2011. – V. 156(1–2). – P. 1–12. Review.

### **3.5. Синтез РНК вируса гриппа**

Когда РНК вируса гриппа проникают в ядро инфицированной клетки, начинается синтез мРНК. Затем эти молекулы транспортируются в цитоплазму к рибосомам, синтез клеточных белков прекращается, и запускается синтез вирусных белков. Однако мРНК не являются абсолютными копиями вРНК: у них отсутствуют последовательности, комплементарные 5'-, и 3'-концам вРНК. Поэтому для производства вирусных РНК, необходимых для сборки новых вирусных частиц, сначала синтезируется полноразмерная (+) цепь, которая в свою очередь копируется в полноразмерную вРНК, и уже эти вРНК используются для сборки новых вирионов. Процесс наглядно изображен на рис. 21, где разграничены процессы синтеза мРНК и репликации. Эти процессы одинаковы для всех восьми сегментов вирусной РНК гриппа.

Многосубъединичный фермент, синтезирующий РНК гриппа, – РНК-зависимая РНК-полимераза – состоит из белков PA, PB1 и PB2, которые присутствуют в каждой вирусной частице. Если этот фермент по каким-либо причинам отсутствует в вирионах, они оказываются неинфекционными, поскольку вирусные РНК с (-) нитью не могут служить матрицей для трансляции белка, а в клетке нет ферментов, способных копировать такую длинную молекулу РНК.



**Рис. 21.** РНК вируса гриппа.

Вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза вируса гриппа – это праймер-зависимый фермент. Фермент не может копировать РНК без затравки – небольшого фрагмента РНК, который подстраивается под матричную РНК и обеспечивает начало процессу синтеза РНК. Праймеры для синтеза вирусных мРНК гриппа получают из клеточных мРНК: вирусная РНК-полимераза расщепляет клеточные мРНК рядом с их 5'-концами, получая необходимые для синтеза РНК праймеры, которые имеют характерную для эукариотических мРНК химическую структуру, именуемую «кэп».

Поскольку РНК-зависимых РНК-полимераз нет в клетках млекопитающих, они являются отличной мишенью для подавления инфекции противовирусными соединениями.

РНК-полимеразы РНК-содержащих вирусов – рекордсмены в синтезе мутантных молекул. Эти ферменты совершают одну ошибку на каждые 1000 – 10000 нуклеотидов, и в отличие от ДНК-зависимой ДНК-полимеразы не могут

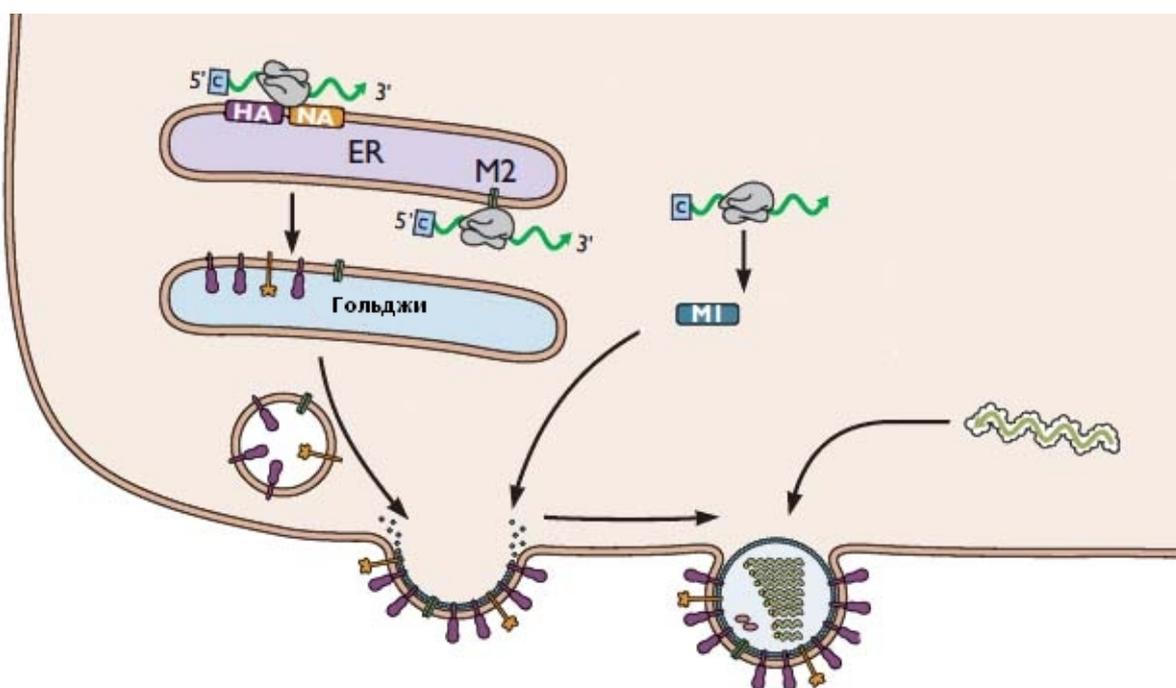
исправить их. С учетом того что геном типичной вирусной РНК насчитывает 10000 оснований, частота 1 в 10000 соответствует в среднем одной мутации на каждый воспроизведенный геном. Если единичная клетка, инфицированная вирусом гриппа, производит 10000 новых вирусных частиц, то в теории по этому коэффициенту ошибок будет произведено 10000 новых вирусных мутантов. Такой огромный уровень мутаций объясняет, почему РНК-вирусы эволюционируют так быстро. Последствием этого является антигенный дрейф вируса гриппа, благодаря которому за 3 – 4 года поверхностные белки вируса изменяются настолько сильно, что специфический иммунитет к прежним вариантам не может защитить человека от инфекции новыми мутантными штаммами.

### **Рекомендуемая литература.**

*Amorim M. J., Digard P. Influenza A virus and the cell nucleus // Vaccine. – 2006. – V. 24(44–46). – P. 6651–6655. Review.*

*Neumann G., Brownlee G. G., Fodor E., Kawaoka Y. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2004. – V. 283. – P. 121–143. Review.*

### **3.6. Сборка вирусной частицы**



**Рис. 22.** Сборка вирусной частицы вируса гриппа.

На рис. 22 показан процесс сборки вирусной частицы. мРНК, кодирующие гликопротеины HA и NA, транслируются рибосомами, которые прикреплены к эндоплазматической сети. Синтезированные белки HA и NA сначала встраиваются в мембрану эндоплазматической сети. Затем эти белки транспортируются на поверхность клетки посредством везикул аппарата Гольджи, которые в итоге сливаются с цитоплазматической мембраной. В результате HA и NA встраиваются в липидную мембрану клетки в правильном направлении. Белок M2 отправляется к этому участку мембраны таким же образом, но пока что непонятно, какой механизм клетки это направляет.

Вирусные РНК, которые впоследствии соберутся в новые вирусные частицы, копируются в ядре клетки и сразу «одеваются» в белок NP, а затем переходят в цитоплазму. Здесь они соединяются с белками полимеразного комплекса PA, PB1, PB2. Все вирусные белки, кроме HA, NA и M2, транслируются на свободных рибосомах, как показано на рис. 22 для белка M1. Белок M1 прикрепляется к мембране, в которую встроены HA, NA и M2. Сюда же направляется и комплекс вирусных РНК и белков (рибонуклеопротеин), после чего вирион формируется путем почкования, образуя свободную частицу.

Отпочковавшиеся новые вирионы должны были бы немедленно присоединиться к рецепторам сиаловой кислоты на поверхности инфицированной клетки, но этого не происходит благодаря действию вирусного гликопротеина NA. Фермент удаляет остатки сиаловой кислоты с поверхности уже инфицированной клетки, так что вновь образовавшиеся вирионы свободно выходят из поврежденной клетки. Этот процесс могут блокировать недавно разработанные лекарственные препараты – ингибиторы нейраминидазы Тамифлю и Реленза. В присутствии этих ингибиторов вирионы отпочковываются от поверхности клетки, но остаются прочно привязанными к ней через рецепторы. Поэтому Тамифлю и Реленза останавливают инфекционный процесс, предотвращая проникновение вновь синтезированных вирусных частиц в другие клетки.

***Рекомендуемая литература.***

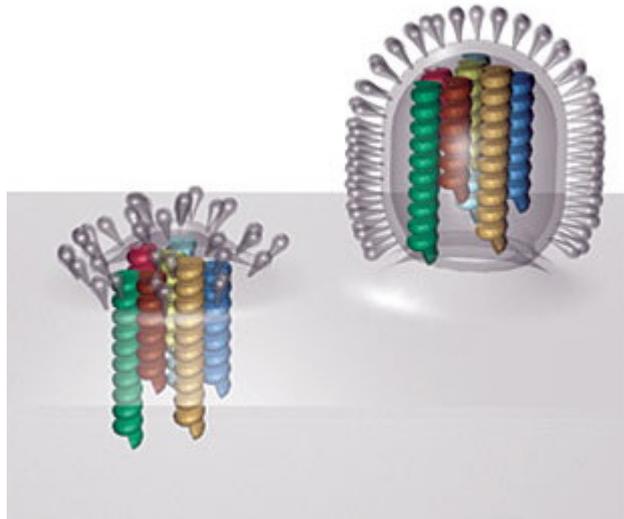
*Rossman J. S., Lamb R. A. Influenza virus assembly and budding // Virology. – 2011. – V. 411(2). – P. 229–236. Review.*

### **3.7. Сборка в вирионе сегментированного РНК-генома**

Для формирования инфекционной вирусной частицы требуется наличие как минимум одной копии каждого из восьми сегментов РНК. Для объяснения того, как вирион получает полный комплект геномной РНК, были предложены два механизма – неупорядоченная и выборочная сборка.

Если восемь сегментов вирусной РНК гриппа неупорядоченно собираются в новые частицы, то в вирусной популяции будет одна инфекционная частица на каждые 400 собранных частиц ( $8!/8^8$ ). Такое соотношение встречается в вирусных популяциях, тем не менее такой механизм маловероятен. Если в каждый вирион может быть собрано больше чем восемь сегментов РНК, тогда доля инфекционных частиц существенно возрастает. Например, если 12 молекул РНК могут быть в составе каждого вириона, то 10 % частиц будут иметь полный вирусный геном. Вероятность существования такого механизма косвенно подтверждается обнаруженными вирионами вируса гриппа с более чем семью сегментами РНК.

При механизме выборочной сборки каждая из восьми геномных РНК имеет отличный от других сигнал, позволяющий проникать в вирусные частицы. Считается, что эти сигналы находятся в некодирующих и кодирующих последовательностях на 5'- и 3'-концах вирусных РНК. Последовательности взаимодействуют и формируют структуры, уникальные по отношению к каждому сегменту и важные для внедрения каждого сегмента в вирионы. С этой гипотезой согласуются данные электронной микроскопии, показавшие, что во время почкования вирусные рибонуклеопротеины организуются в отдельные структуры, как показано на рис. 23.



**Рис. 23.** Структуры рибонуклеопротеина при формировании вирусной частицы.

На основании этого наблюдения весьма правдоподобным является утверждение о том, что рибонуклеопротеины не случайным образом внедряются в вирионы. Наличие специфических последовательностей в каждом сегменте РНК также служит доказательством этой гипотезы. Правда, механизмы, при помощи которых распознаются эти сигналы, неизвестны, как и то, каким образом они обеспечивают входение только одной копии каждого сегмента РНК в частицу.

Одним из возможных механизмов может быть процесс сборки, описанный для бактериофага  $\psi 6$ . Вирусные частицы содержат одну копию каждого из сегментов S, M и L РНК. Все собранные частицы содержат полный комплект сегментов генома (это подтверждается тем фактом, что каждая вирусная частица инфекционна). Первым во вновь образовавшуюся частицу проникает сегмент S РНК; только после этого входит сегмент M РНК. L РНК может проникнуть лишь в частицы, содержащие оба сегмента S и M. Поэтому точная сборка является результатом периодически зависимой сборки сегментов РНК.

***Рекомендуемая литература.***

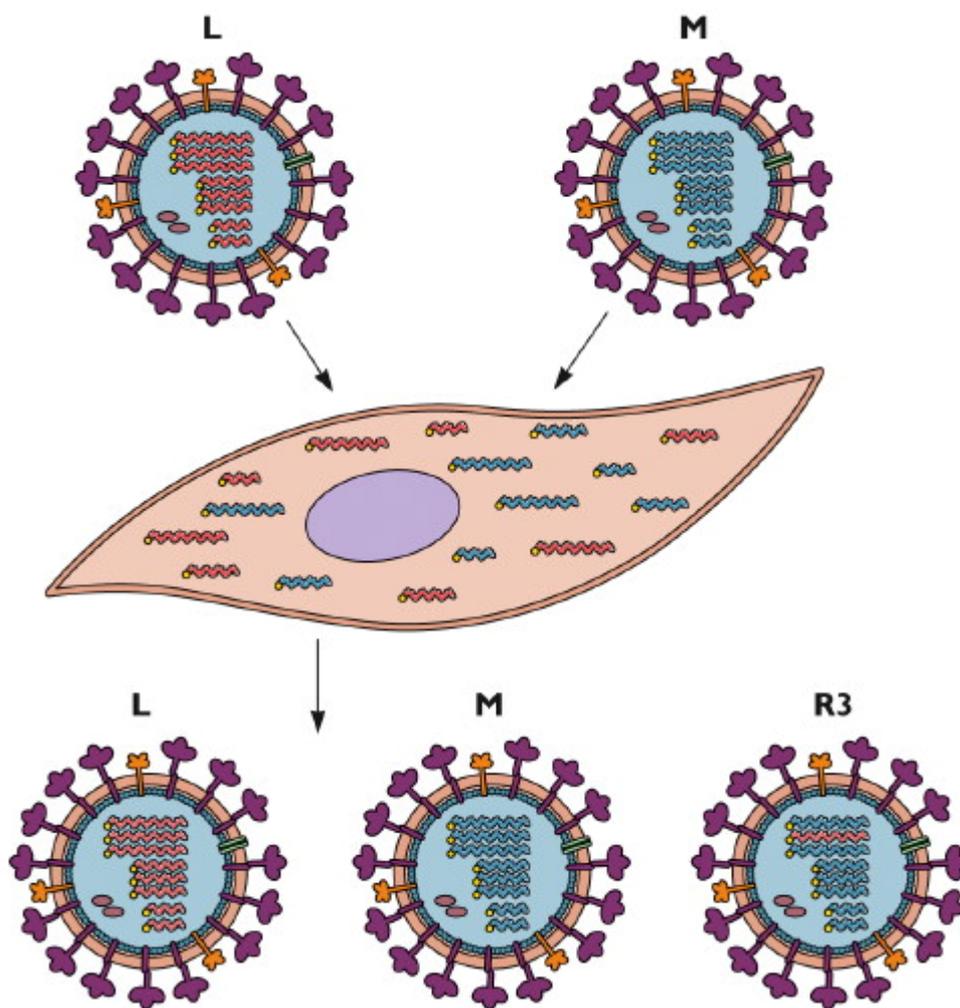
*Noda T., Kawaoka Y. Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions // Reviews in Medical Virology. – 2010. –V. 20(6). – P. 380–391.*

*Wu C. Y., Jeng K. S., Lai M. M.* The SUMOylation of matrix protein M1 modulates the assembly and morphogenesis of influenza A virus // *Journal of Virology.* – 2011. – V. 85(13). – P. 6618–6628.

### **3.8. Реассортация вирусных геномов**

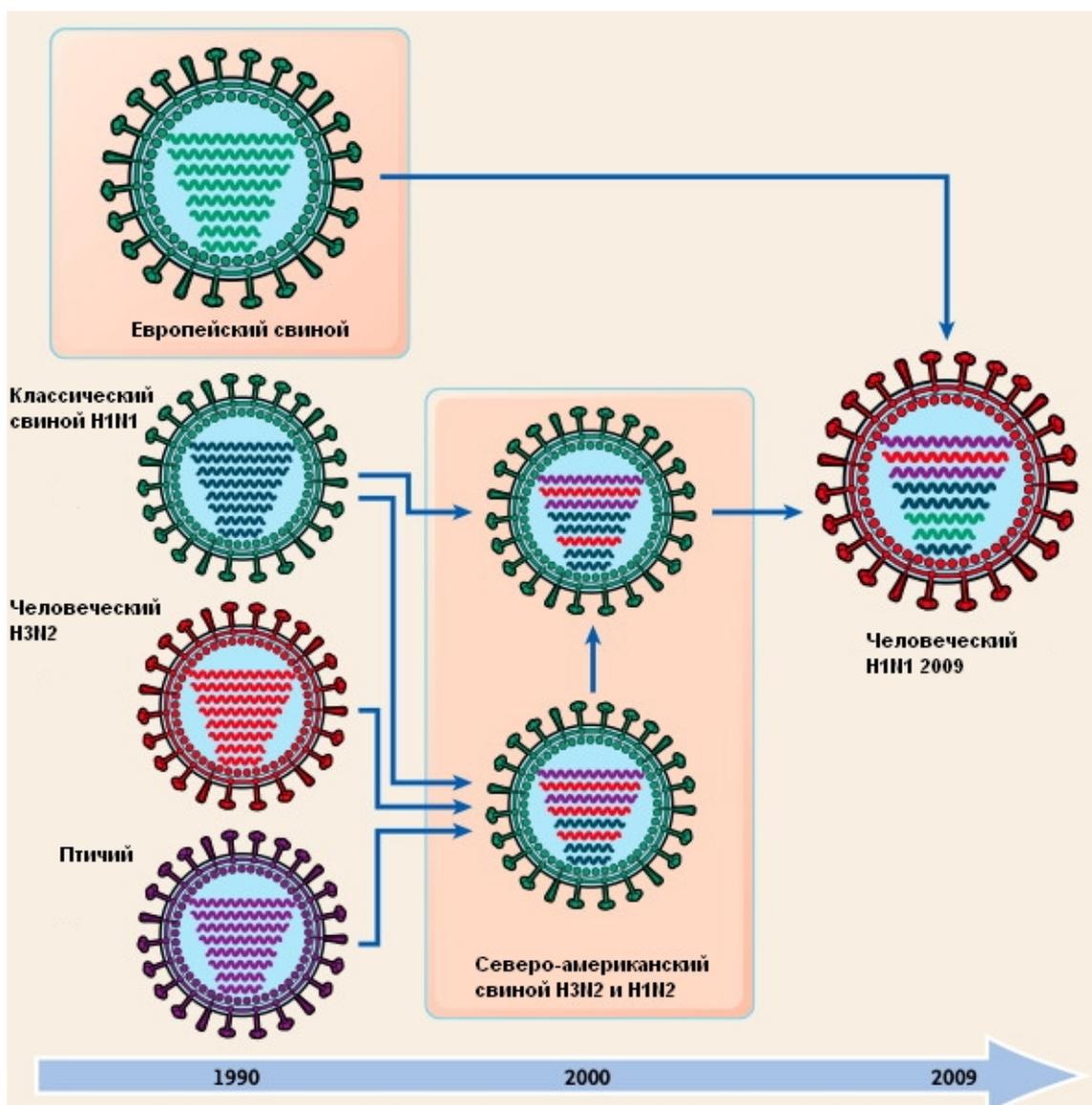
Мутации – важный источник разнообразия вирусов, однако вирусы с сегментированным геномом, такие как вирус гриппа, используют и другой механизм для создания разнообразия – реассортацию, или пересортировку генов.

Если клетка инфицирована двумя различными вирусами гриппа, то в ее ядре копируются РНК обоих вирусов. При сборке в новые вирусные частицы могут попасть сегменты РНК от разных вирусов. Вирусы, наследующие РНК от обоих родителей, называются реассортантами. Схема процесса реассортации показана на рис. 24, где изображена клетка, коинфицированная двумя различными штаммами вируса гриппа, обозначенными L и M. Зараженная клетка производит оба родительских вируса и реассортант R3, который наследует один сегмент РНК из штамма L, а другие – из штамма M. На самом деле реассортантов в таком эксперименте появляется много – теоретически их может быть 256, но не все могут оказаться жизнеспособными, и мы приводим реассортант R3 в качестве только одного примера из них.



**Рис. 24.** Появление реассортанта в результате коинфицирования.

В настоящее время большинство исследователей разделяет точку зрения, что пандемические вирусы гриппа появляются в результате обмена генами между вирусами человека и животных. Так, молекулярно-генетические исследования показали, что, например, пандемический штамм A(H1N1)pdm2009 – это тройной реассортант, несущий гены вирусов птиц, человека и свиньи, как показано на рис. 25.



**Рис. 25.** Появление вируса гриппа A(H1N1) pdm2009 в результате реассортации.

Реассортация может происходить только между вирусами гриппа одного рода. Непонятно, почему вирусы гриппа А никогда не обмениваются сегментами РНК с вирусами гриппа В или С. Возможно, причина связана с различиями в механизмах их сборки и репликации, еще не изученных до конца.

**Рекомендуемая литература.**

Howard W. A., Essen S. C., Strugnell B. W., Russell C., Barass L., Reid S. M., Brown I. H. Reassortant pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, United Kingdom // Emerging Infectious Diseases. – 2011. – V. 17(6). – P. 1049–1052.

Trifonov V., Khiabani H., Rabadan R. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus // New England Journal of Medicine. – 2009. – V. 361(2). – P. 115–119.

## ГЛАВА 4. ПАТОГЕНЕЗ

### 4.1. Передача вируса гриппа



**Рис. 26.** Распространение вируса при чихании.

Вирус гриппа может распространяться среди людей тремя путями: 1) при непосредственном контакте с зараженными людьми; 2) при контакте с зараженными предметами (так называемыми формитами, например, игрушками, дверными ручками); 3) при вдыхании вирусосодержащих аэрозолей. Воздушно-капельная передача обусловлена появлением аэрозолей, содержащих вирусные частицы, в процессе дыхания, во время разговора или пения, а кашель и чихание приводят к их усиленному выбросу. И если кашель приводит к появлению нескольких сотен капель аэрозоля, то их количество при чихании в среднем достигает 20000. Распыленные частицы, производимые кашлем и чиханием, имеют различные размеры. Самые большие капли падают на землю в нескольких метрах и могут инфицировать только тех, кто оказался в непосредственной близости. Другие капли преодолевают пространство в зависимости от своего размера. Капли диаметром 1 – 4 микрона остаются в подвешенном состоянии в воздухе в течение очень долгого времени и преодолевают большие дистанции. Во время вдыхания аэрозольных капель средних размеров вирус проникает в верхние дыхательные пути, а в случае мелких капель – даже в нижние дыхательные пути.

Значительность аэрозольной передачи была подтверждена вспышкой гриппа на борту самолета в конце 1970-х гг. Произошла трехчасовая задержка рейса самолета с 54 пассажирами, во время которой не работала система вентиляции. Большинство пассажиров оставались на борту. В течение 72 часов примерно у 75 % пассажиров появились симптомы гриппа, а источником заражения был всего лишь один человек.

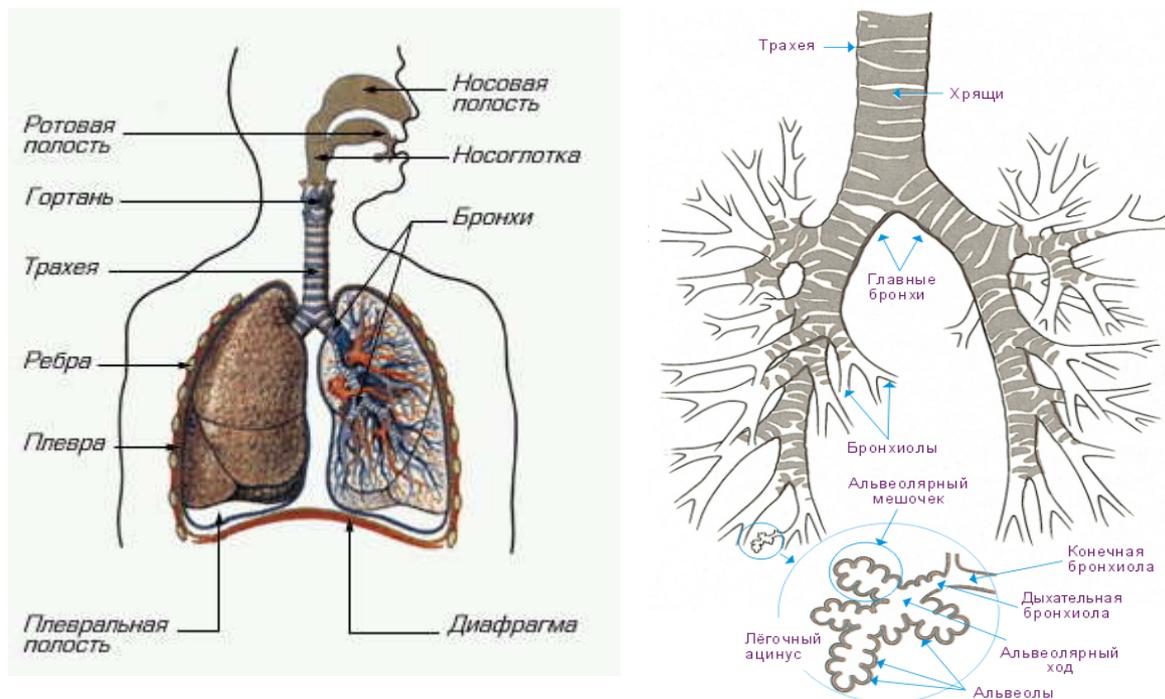
Как правило, носовые секреты, содержащие вирусные частицы, ответственны за передачу при прямом контакте или контакте с зараженными объектами. Заболевший человек часто трогает нос или конъюнктиву, и вирус попадает на руку. При контакте (например, пожатию рук или через дверные ручки) вирус передается другому человеку, который заразится, если в свою очередь прикоснется к носу или глазам. Когда зараженными руками трогают другие предметы, вирус переносится на них. Согласно одному исследованию, от 23 до 59 % предметов в доме, где живет больной гриппом человек, несут на себе вирусные РНК гриппа. В других исследованиях показано, что инфекционный вирус гриппа может выживать на бумажных деньгах до нескольких недель.

Передачу вируса гриппа можно ослабить, если больной закрывает нос и рот во время кашля и чихания, если здоровый человек, находящийся рядом с больным, максимально часто моет руки водой с мылом или дезинфицирующими очищающими средствами для рук. Маски для лица в целях снижения распространения вируса малоэффективны. Важно помнить, что при инфекционных заболеваниях человека максимальный уровень вирусовыделения имеет место примерно за день до максимального проявления симптомов.

### **Дыхательные пути – ворота гриппозной инфекции.**

Обычно вирус гриппа поражает дыхательные пути. Это наиболее простой путь для проникновения вируса из-за незащищенной поверхности слизистой оболочки и интенсивности дыхания. Ведь в спокойном состоянии через дыхательные пути человека проходит 6 литров воздуха в минуту. Каждую минуту в дыхательные пути проникает большое количество инородных частиц и капель аэрозоля, нередко содержащих вирионы. Причина того, что мы не боеем постоянно, скрывается в том, что дыхательные пути обладают множеством защитных механизмов. В большом числе представлены механические препятствия: реснитчатый эпителий, слизисто-секреторные бокаловидные клетки и субэпителиальные слизисто-секреторные железы. Инородные частицы, проникающие в носовую полость или верхние дыхательные пути, задерживаются в слизи и направляются к задней стенке глотки, а затем проглатываются. Если

частицы достигли нижних дыхательных путей, они могут быть остановлены слизью, которая затем выталкивается из легких мерцанием ресничек. Самые нижние уровни дыхательных путей – альвеолы – лишены ресничек. Однако они несут на поверхности макрофаги, которые поглощают и разрушают частицы.



**Рис. 27.** Дыхательные пути человека.

### **Рекомендуемая литература.**

*Belser J. A., Jayaraman A., Raman R., Pappas C., Zeng H., Cox N. J., Katz J. M., Sasisekharan R., Tumpey T. M.* Effect of D222G mutation in the hemagglutinin protein on receptor binding, pathogenesis and transmissibility of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus // PLoS One. – 2011. – V. 6(9). – e25091.

*Boon A. C., Finkelstein D., Zheng M., Liao G., Allard J., Klumpp K., Webster R., Peltz G., Webby R. J.* H5N1 influenza virus pathogenesis in genetically diverse mice is mediated at the level of viral load // MBio. – 2011, Sep. 6. – V. 2(5). – e00171–11.

## **4.2. Сезонность гриппа**

Почему вирусные инфекции верхних дыхательных путей наиболее активны в зимние месяцы? Дело в том, что большинство острых вирусных инфекций (ОРВИ) имеют явные сезонные колебания в распространении инфекции. Как

правило, респираторные вирусные инфекции преобладают в зимние месяцы, тогда как энтеровирусные инфекции доминируют летом. В умеренном климате Северного полушария заражение гриппом происходит в основном с ноября по март. Было предложено несколько объяснений этому, а наиболее убедительное недавно было подтверждено на модели морской свинки. В этом исследовании была доказана зависимость распространения вируса гриппа воздушно-капельным путем от температуры и влажности.

Для того чтобы исследовать передачу гриппа, авторы поместили зараженных и незараженных морских свинок в камеру искусственного климата. Выяснилось, что передача инфекции была наиболее эффективной при влажности 20 – 35 % и блокировалась при влажности 80 %. Более того, передача с большей вероятностью происходила при 5°C, чем при 20°C. Авторы сделали вывод, что атмосферные условия зимних месяцев – низкая температура и влажность – способствуют распространению инфекции.

Любопытно, что аэрозольный путь передачи гриппа блокируется при 30°C. Это наблюдение не согласуется с тем фактом, что в тропическом климате гриппозная инфекция встречается в течение всего года. В другой работе эти же авторы показали, что передача вируса гриппа при непосредственном контакте эффективна и при высокой температуре. Поэтому возможно, что близкий контакт или распространение на очень короткие расстояния – преобладающие пути передачи гриппа в тропиках.

#### ***Рекомендуемая литература.***

*Fukuyama S., Kawaoka Y.* The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors // *Current Opinion in Immunology*. – 2011. – V. 23(4). – P. 481–486. Review.

*Gaur P., Munjhal A., Lal S. K.* Influenza virus and cell signaling pathways // *Medical Science Monitor*. – 2011. – V. 17(6). – P. RA148–154. Review.

*Maines T. R., Szretter K. J., Perrone L., Belser J. A., Bright R. A., Zeng H., Tumpey T. M., Katz J. M.* Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mam-

### 4.3. Врожденный иммунитет

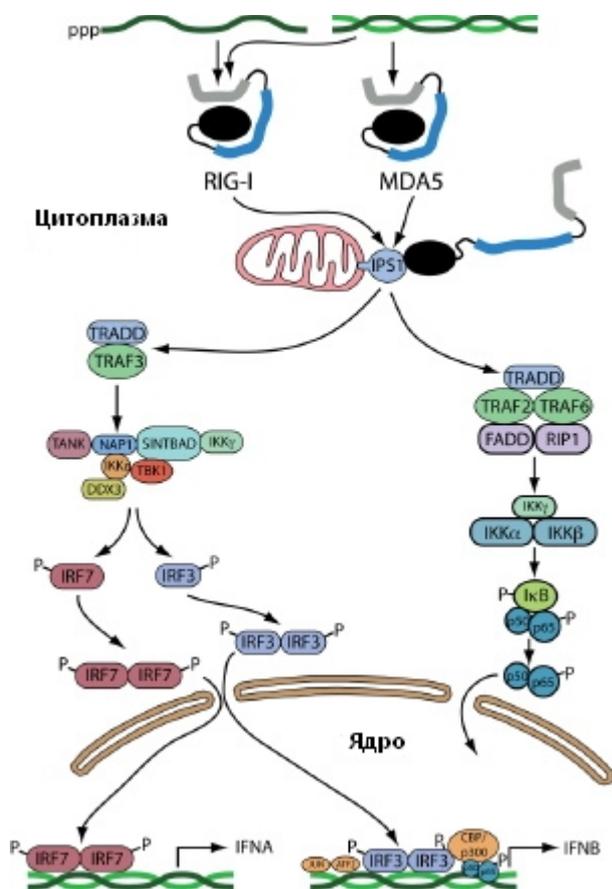


Рис. 28. Индукция синтеза цитокинов.

Для первоначальной защиты от вирусной инфекции позвоночные обладают замечательной системой врожденного иммунитета. Врожденный иммунный ответ считается первой линией иммунной защиты, поскольку он активен даже до начала инфекционного процесса. В действительности многие вирусные инфекции предотвращаются врожденной иммунной системой, которая реагирует очень быстро – от нескольких минут до нескольких часов после инфицирования.

Главное свойство врожденной иммунной системы – способность распознать вирусы как инородные агенты.

Вирусные белки и нуклеиновые кислоты отграничиваются от клеточных посредством клеточных белков, называемых рецепторами распознавания образа (или патогена) – RIG (рис. 28). Эти белки присутствуют или в цитоплазме клетки, или на клеточной мембране, где они определяют вирусные компоненты. Например, цитоплазматический белок RIG-I распознает двунитевую РНК или однонитчатую РНК с 5'-трифосфатом. Этих типов РНК обычно нет в цитоплазме незараженных клеток. Когда RIG-I связывает эти вирусные РНК, происходит серия реакций, приводящая к синтезу цитокинов. Мембранно-связанные толл-подобные рецепторы (TLR) узнают вирусные гликопротеины, двунитевые и однонитчатые РНК, последовательность CpG в вирусной ДНК. Взаимодействие толл-подобных рецепторов с вирусос-

специфическими лигандами также приводит к синтезу цитокинов, хотя и другими путями. Появление цитокинов в крови – один из наиболее ранних показателей заражения хозяина вирусом. Инфицированными клетками производятся свыше 80 известных цитокинов, первыми из которых являются  $\alpha$ - и  $\beta$ -интерфероны (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), фактор некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкин-6 (IL-6), IL-12 и IFN- $\gamma$ .

Цитокины действуют локально, взаимодействуя с рецепторами других клеток. Например, IFN, вырабатываемый зараженными клетками, прикрепляется к рецепторам соседних клеток. Соседние же клетки в ответ производят сотни клеточных белков с противовирусной активностью. Когда цитокины в большом количестве выходят наружу, именно их действие начинает вызывать симптомы, типичные для многих вирусных инфекций, включая жар, бессонницу, вялость, боль в мышцах, потерю аппетита и тошноту.

Другим важным компонентом иммунного ответа является активность дендритных клеток и макрофагов, находящихся на внешних границах организма, таких как кожа и слизистые оболочки. Дендритные клетки связывают цитокины, производимые зараженными клетками, а также поглощают вирусные белки, выходящие из погибших клеток, пораженных вирусом. И вследствие этих сигналов они производят большое количество цитокинов, чтобы усилить изначальный ответ.

При многих вирусных инфекциях раннее действие цитокинов, синтезируемых зараженными и дендритными клетками, достаточно для уничтожения патогена. Если врожденная защита не справляется и репликация вируса не остановлена, то для сохранения жизни хозяина мобилизуется защита второго уровня. Она включает в себя адаптивный иммунный ответ – антитела и иммунокомпетентные клетки. Требуется от нескольких дней до недель, чтобы сформировался адаптивный иммунный ответ, специфически приспособленный к инфицирующему вирусу. Поэтому решающим при встрече с вирусом гриппа является врожденный или уже имеющийся приобретенный иммунный ответ.

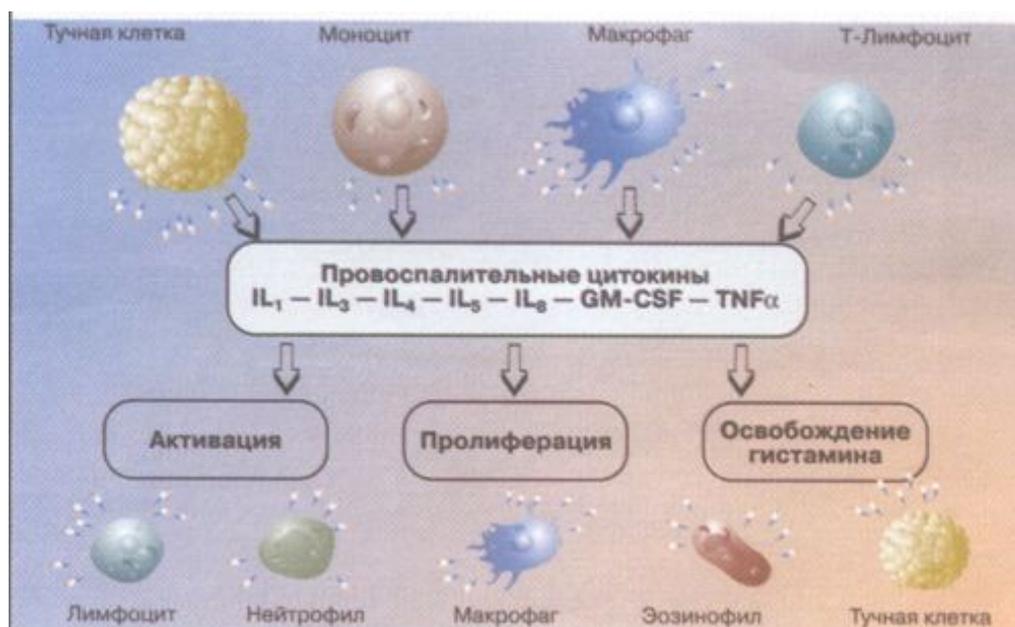
***Рекомендуемая литература.***

Baum A., García-Sastre A. Differential recognition of viral RNA by RIG-I // Virulence. – 2011. – V. 2(2). – P. 166–169.

Doherty P. C., Brown L. E., Kelso A., Thomas P. G. Immunity to avian influenza A viruses // Revue scientifique et technique. – 2009. – V. 28(1). – P. 175–185. Review.

Sládková T., Kostolanský F. The role of cytokines in the immune response to influenza A virus infection // Acta Virologica. – 2006. – V. 50(3). – P. 151–162.

#### 4.4. Воспалительная реакция



**Рис. 29.** Роль цитокинов в воспалении.

Источник: Козлов В. С., Шиленкова В. В., Чистякова О. Д. Роль воспаления в патогенезе респираторных заболеваний // Consilium Medicum. – 2003. – Т. 5(10).

Цитокины синтезируются на ранних стадиях вирусной инфекции, когда включается врожденная иммунная защита. Быстрый выход цитокинов на участке инфицирования вызывает новые ответы, включающие воспаление.

В числе первых цитокинов появляется ФНО- $\alpha$ , синтезируемый активированными моноцитами и макрофагами. Этот цитокин изменяет ближние капилляры таким образом, чтобы циркулирующие лейкоциты легко доставлялись к участку заражения. ФНО- $\alpha$  также может связываться с рецепторами инфицированной клетки и вызывать противовирусный ответ. Таким образом, в течение нескольких секунд или десятков секунд возникают серии сигналов, ведущих к

некрозу инфицированной клетки, – это попытка заблокировать распространение инфекции.

Существует четыре типичных признака воспаления: эритема (покраснение), повышенная температура, отек и боль. Это последствия усиленного кровотока и проницаемости капилляров, которые приводят к притоку фагоцитарных клеток и повреждению ткани. Усиленный кровоток вызывается сужением капилляров, выносящих кровь из зараженной области, что приводит к закупорке капиллярной сети. Сужение капилляров сопровождается эритемой и повышением температуры. Вдобавок увеличивается проницаемость капилляров, позволяя выйти клеткам и жидкости и проникнуть в окружающую ткань. Эти жидкости имеют повышенное содержание белка по сравнению с жидкостями, находящимися в ткани в обычных условиях, и вызывают отек.

Другой чертой воспаления является присутствие иммунокомпетентных клеток, в значительной степени – одноядерных фагоцитов. Нейтрофилы – один из наиболее ранних типов фагоцитарных клеток, которые проникают в зараженный участок и являются классическими маркерами воспалительной реакции (рис. 29). Эти клетки в избытке присутствуют в крови и обычно отсутствуют в ткани. Вместе с зараженными и дендритными клетками и макрофагами они синтезируют цитокины, которые обеспечивают ответ на инфекцию, а также регулируют возможный адаптивный ответ.

Воспалительная реакция в большой степени управляема. Одной из значительных составляющих является «инфламмосома» – особая цитоплазматическая структура в макрофагах и нейтрофилах со свойствами рецепторов и инициаторов передачи сигнала (например, MDA-5 и RIG-I). Недавние экспериментальные данные показали, что инфламмосома имеет большое значение во врожденном иммунном ответе на заражение вирусом гриппа и в замедлении патологического процесса в легких при гриппозной пневмонии.

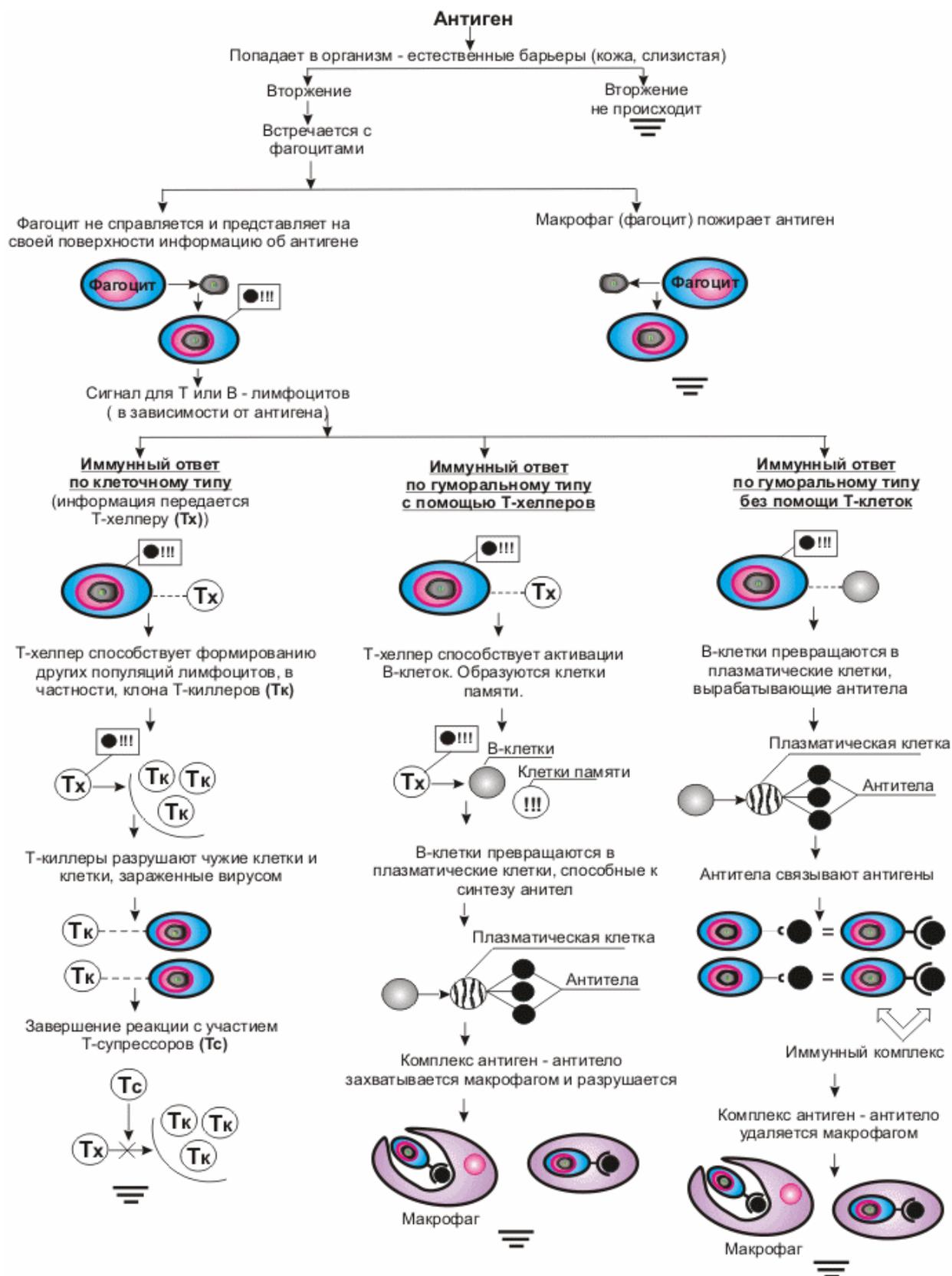
#### ***Рекомендуемая литература.***

*Thomas P., Dash P., Aldridge Jr. J., Ellebedy A., Reynolds C., Funk A., Martin W., Lamkanfi M., Webby R., Boyd K. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate*

and healing responses to influenza A virus via the regulation of Caspase-1 // *Immunity*. – 2009. – V. 30(4). – P. 566–575.

*Trammell R. A., Toth L. A.* Genetic susceptibility and resistance to influenza infection and disease in humans and mice // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. – 2008. – V. 8(4). – P. 515–529. Review.

## 4.5. Адаптивная иммунная защита



**Рис. 30.** Схема адаптивного иммунного ответа.

Когда репликация вируса опережает врожденную защиту, срабатывает адаптивный ответ. Адаптивная защита состоит из антител и лимфоцитов, часто

называемых гуморальным ответом и клеточным иммунным ответом. Способность формировать специфический к вирусу ответ зависит от взаимодействия между врожденной и адаптивной системами. Эта связь осуществляется цитокинами, а также межклеточным взаимодействием между дендритными клетками и лимфоцитами в лимфоузлах. Это взаимодействие настолько важно, что адаптивный ответ не может быть запущен без врожденной иммунной системы.

И гуморальный, и клеточный иммунные ответы – важнейшие в системе противовирусной защиты. Вклад каждой из них отличается в зависимости от вируса и хозяина. Антитела главным образом взаимодействуют с вирусными частицами в крови и на поверхности слизистых оболочек, тем самым блокируя распространение инфекции. При этом Т-клетки распознают и убивают инфицированные клетки.

Главной отличительной чертой адаптивного иммунного ответа является иммунная память. Благодаря ей повторные инфекции, вызванные тем же вирусом, немедленно сталкиваются с сильным специфическим ответом, который обычно эффективно останавливает инфекцию, практически не используя врожденную систему.

Первый адаптивный ответ на вирус, называемый первичным ответом, часто занимает период до нескольких дней. Напротив, бустер-эффект развивается в течение первых часов после инфицирования. При этом иммунная память поддерживается подмножеством В- и Т-лимфоцитов, которые называются клетками памяти, живущими многие годы. Клетки памяти остаются готовыми к быстрому и эффективному ответу на последующие столкновения с патогеном. Этот так называемый вторичный ответ очень часто сильнее первичного ответа на инфекцию, поэтому иммунитет, который дает вакцинация, очень важен и может сохраняться долгие годы.

### ***Рекомендуемая литература.***

*Kreijtz J. H., Fouchier R. A., Rimmelzwaan G. F. Immune responses to influenza virus infection // Virus Research. – 2011. – V. 162(1–2). – P. 19–30.*

Qiu C., Tian D., Wan Y., Zhang W., Qiu C., Zhu Z., Ye R., Song Z., Zhou M., Yuan S., Shi B., Wu M., Liu Y., Gu S., Wei J., Zhou Z., Zhang X., Zhang Z., Hu Y., Yuan Z., Xu J. Early adaptive humoral immune responses and virus clearance in humans recently infected with pandemic 2009 H1N1 influenza virus // PLoS One. – 2011. – V. 6(8). – e22603.

#### 4.5.1. Антитела в системе адаптивной иммунной защиты

Структурная единица иммуноглобулина состоит из двух тяжелых и двух легких цепей, как показано на рис. 31.

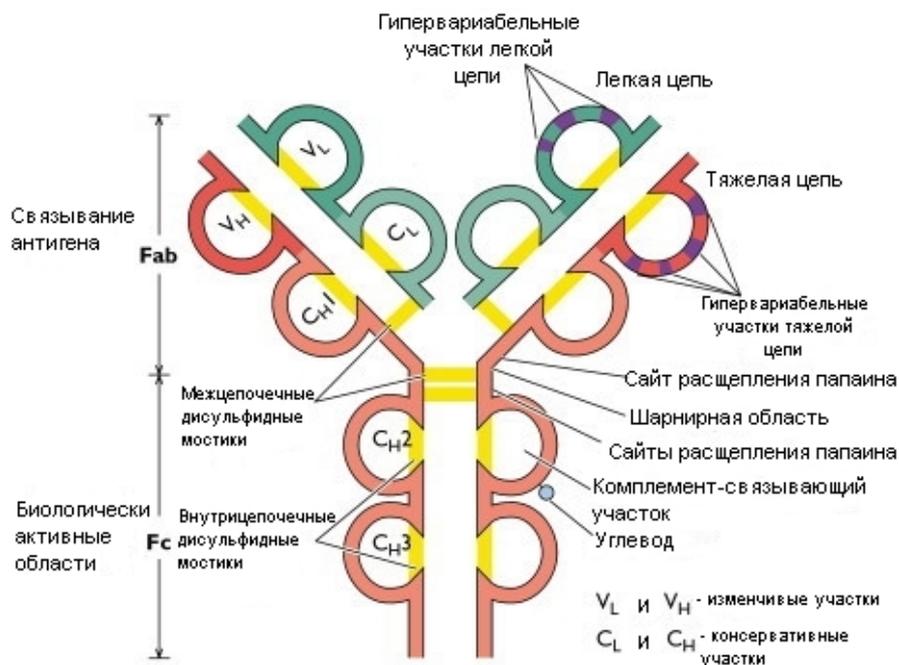
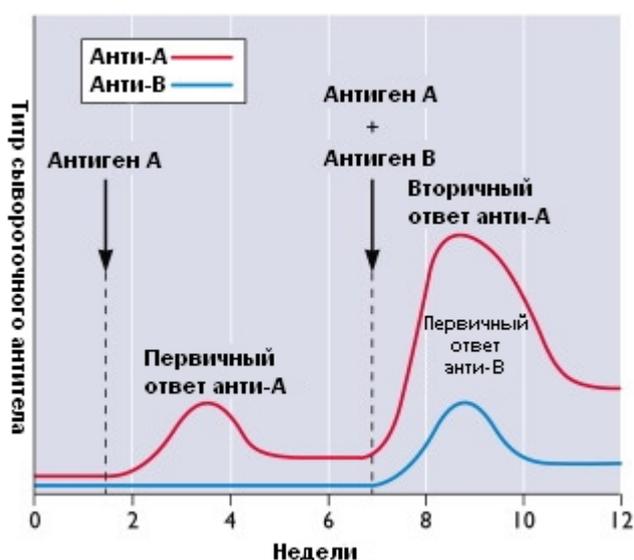


Рис. 31. Схема строения иммуноглобулина.

Основная функция антител – связывать антигены. Взаимодействие происходит на небольших участках рядом с концами тяжелой и легкой цепей, которые называются гипервариабельными участками (такой участок показан только на одном ответвлении на рис. 31). Часть антигена, распознаваемая антителом, называется эпитоп.

Существует пять классов иммуноглобулинов – IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, – определяемых по аминокислотной последовательности тяжелой цепи. У них различные роли в иммунных ответах; иммуноглобулины IgG, IgA и IgM обычно возникают после инфицирования организма вирусами.

Во время первой встречи с вирусом происходит первичный гуморальный иммунный ответ. Вначале появляются IgM в крови, через несколько дней начинают вырабатываться IgA на поверхностях слизистых оболочек и, наконец, IgG – в сыворотке. Антитела класса IgG – главные в адаптивном иммунном ответе и очень устойчивые, с периодом полураспада от 7 до 21 дня. Когда организм инфицируется таким же или подобным вирусом, происходит быстрое образование антител, называемое вторичным гуморальным иммунным ответом. Временные характеристики гуморального иммунного ответа показаны на графике (рис. 32).



**Рис. 32.** Динамика адаптивного гуморального иммунного ответа.

Когда животному введена смесь обоих антигенов А и В на седьмую неделю, то вторичный ответ на антиген А – более быстрый и сильный в сравнении с первичным ответом на антиген В. Уровни антител (или титры антител) со временем снижаются.

Антитела очень важны для предотвращения многих вирусных инфекций и способствуют прекращению начавшегося инфекционного процесса.

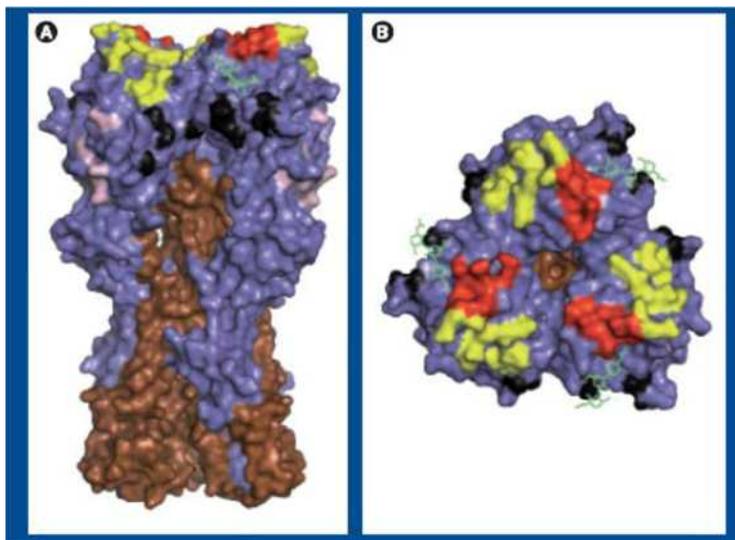
#### 4.6. Нейтрализация вируса антителами

Когда человек инфицируется вирусом гриппа, вырабатываются антитела против эпитопов (антигенных сайтов) всех вирусных белков, но самые важ-

Динамика типичного адаптивного гуморального иммунного ответа показана как относительная концентрация сывороточных антител спустя несколько недель после введения животному антигена А или смеси антигенов А и В. Максимальный первичный ответ на антиген А проявляется между третьей и четвертой неделями. Когда животному введена смесь обоих антигенов

ные – это антитела против поверхностных белков HA и NA, поскольку подмножество этих антител наиболее эффективно блокирует вирусную инфекцию.

Антитела могут нейтрализовать вирус несколькими способами. Антитела против антигенных сайтов HA мешают взаимодействию вирионов с рецепторами, блокируют внедрение вируса в клетки, предотвращают декапсидацию геномов в эндосомах. Антитела против NA вызывают залипание вирусных частиц друг на друге.



**Рис. 33.** Антигенные сайты HA. Компьютерная модель HA штамма A/PR/8/34 (H1N1). **А** – вид сбоку. **В** – вид сверху. HA1 и HA2 выделены синим и коричневым соответственно, сиаловая кислота – зеленым. Антигенные сайты: Sa (желтый), Sb (красный), Ca (черный) и Cb (розовый).

Источник: DeLano Scientific LLC, CA, USA.

После вирусного инфицирования возникают и ненейтрализующие антитела. Такие антитела специфически связываются с вирусными частицами, но не нейтрализуют вирус. Они могут даже усилить инфекционность, поскольку антитела способны взаимодействовать с рецепторами на макрофагах, после чего комплекс вирус – антитело попадает в макрофаги посредством эндоцитоза. Этот путь позволяет вирусу проникнуть в клетки, не имеющие рецепторов для вируса гриппа.

### ***Рекомендуемая литература.***

*Hoft D. F., Babusis E., Worku S., Spencer C. T., Lottenbach K., Truscott S. M., Abate G., Sakala I. G., Edwards K. M., Creech C. B., Gerber M. A., Bernstein D. I., Newman F., Graham I., Anderson E. L., Belshe R. B. Live and inactivated influenza*

vaccines induce similar humoral responses, but only live vaccines induce diverse T-cell responses in young children // *Journal of Infectious Diseases*. – 2011, Sep. 15. – V. 204(6). – P. 845–853.

## ГЛАВА 5. ПРОФИЛАКТИКА ГРИППА

Всемирной организацией здравоохранения в качестве основной стратегии борьбы с гриппом рекомендована вакцинация, которая, по данным ВОЗ, при совпадении антигенных характеристик вакцинных и циркулирующих штаммов способна снизить заболеваемость на 60 – 90 %. Вакцинация показана всем людям, среди которых наблюдается повышенный уровень заболеваемости и смертности вследствие перенесенной гриппозной инфекции. Согласно результатам проведенных исследований, в группу риска повышенной смертности от заболеваний гриппом входят лица в возрасте старше 65 лет, а также лица, имеющие хронические заболевания, такие как хроническая обструктивная болезнь легких, астма, сердечные заболевания, диабет, неопластические заболевания, хронические заболевания печени, легких, соединительной ткани.

Однако вакцинопрофилактика оказывается неэффективной при появлении новых вариантов вируса гриппа, существенно отличных по антигенным свойствам от циркулировавших ранее. В последнее время все больше людей отказываются от вакцинации, особенно если у них до этого наблюдались побочные эффекты, вызванные вакцинацией, или если ранее после вакцинации у них развилась респираторная вирусная инфекция. Кроме того, противогриппозная вакцина эффективна только для 40 – 60 % пожилых людей и пациентов с иммуносупрессией, вызванной хроническими заболеваниями или приемом лекарств, так как у этих людей не может сформироваться достаточного количества антител. В таком случае только специфические этиотропные препараты могут облегчить течение болезни и снизить смертность от постгриппозных осложнений.

Большинство людей, не входящих в группу риска, при заболевании гриппом не нуждаются в специфической этиотропной терапии. Однако она необходима в начальный период новой пандемии, когда у большинства населения отсутствует специфический иммунитет к новому варианту вируса. Использование противогриппозных препаратов с лечебной целью приводит к уменьшению

длительности заболевания лишь на 1 – 2 дня, но их прием необходим при инфекции, вызванной высокопатогенными штаммами вируса гриппа. Показания к применению противогриппозных препаратов перечислены в табл. 3.

**Таблица 3.** Показания к применению противогриппозных препаратов.

Показания к применению противогриппозных препаратов	Факторы, указывающие на необходимость приема противогриппозных препаратов	Пример
Вакцина неиммуногенна	Гриппоподобные заболевания у: – людей с иммуносупрессией; – невакцинированных людей, проживающих совместно с людьми с иммуносупрессией; – жителей домов престарелых	Пациент с хронической лимфоцитарной лейкемией с гипогаммаглобулинемией; пациент, принимающий лекарственные препараты с иммуносупрессорным действием.
Пациент находится в группе риска и не был вакцинирован	Внезапная эпидемия гриппа у пациентов, находящихся в группе риска; осложнения и смертельные случаи от пневмонии	Пациенты с хронической сердечной недостаточностью, хроническими заболеваниями печени или почек, диабетом; престарелые пациенты.
Вакцина не соответствует циркулирующему штамму вируса гриппа	Гриппоподобные заболевания у вакцинированных людей	

Противогриппозные препараты проявляют сопоставимую эффективность в отношении десятков антигенных вариантов вируса, включающих 16 различных субтипов NA и девять субтипов NA. Столь широкий диапазон антигенного разнообразия совершенно непреодолим для имеющегося спектра живых и убитых вакцин.

Надо отметить, что спектр препаратов, обладающих специфической активностью в отношении вируса гриппа и разрешенных к использованию, невелик. К ним относятся препараты адамантанового ряда (амантадин и ремантадин), ингибиторы нейраминидазы (озельтамивир и занамивир). В России широкое распространение получил также арбидол (табл. 4).

**Таблица 4.** Противогриппозные препараты, разрешенные к применению в РФ.

Мишень действия лекарственного препарата	Название препарата	Суточная доза для взрослых	Способ введения	Длительность лечения (в днях)	Побочные эффекты
Ионный канал M2	амантадин и ремантадин	300 мг – 1 сут.; 200 мг – 2 и 3 сут.; 100 мг – 4	оральный	5	В 0 – 15 % случаев возможны раздражительность, бессонница, ночные кошмары, галлю-

		и 5 сут.			цинации.
НА	занамивир	20 мг	аэрозольный	5	Возможно ухудшение течения астматических заболеваний.
	озельтамивир	150 мг	оральный	5	В 8 – 10 % случаев наблюдается тошнота, рвота, которая обычно длится 1 – 2 дня.
НА	арбидол	1000 мг	оральный	5	Возможны аллергические реакции.

### 5.1. Препараты адамантанового ряда

Амантадин и его метилированное производное ремантадин (*Rimantadini hydrochloridum*) были открыты в 1960-х гг. сотрудниками фирмы DuPont. Амантадин используется для лечения и профилактики гриппа с середины 1960-х гг. Однако наибольшее распространение получил ремантадин. Он является более совершенным по профилактическому и лечебному действию и оказывает меньше побочных эффектов, чем амантадин.

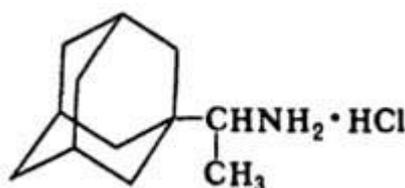
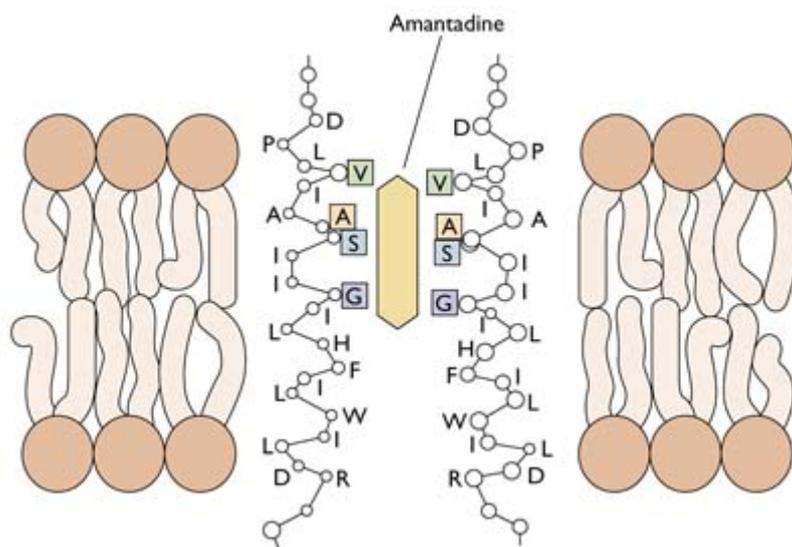


Рис. 34. Структура ремантадина.

Тем не менее использование препаратов адамантанового ряда ограничено наличием побочных эффектов и широким распространением резистентных к ним штаммов вируса гриппа. Кроме того, адамантаны эффективны только в отношении вируса гриппа типа А, поскольку вирусы гриппа типа В вместо М2-белка, который является мишенью действия препаратов, содержат NB-белок.

Чтобы лучше понять механизм действия препаратов адамантанового ряда, необходимо вспомнить, что происходит на начальных этапах инфекции. После проникновения вируса в клетку кислый рН внутри эндосомы способствует активации или открытию ионных каналов (М2-белки), что дает возможность ионам водорода проникнуть внутрь вирусной частицы. Понижение рН необходимо для освобождения нуклеокапсида («раздевание вируса»).

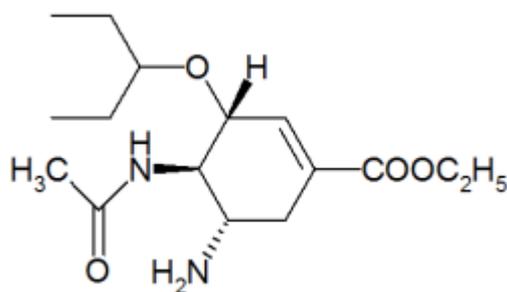


**Рис. 35.** Ионный канал M2, являющийся мишенью для противовирусных адамантанов.

Адамантаны забивают канал и не позволяют протонам закачиваться в вирион, вирусные РНК остаются прикрепленными к М1 и не могут достичь ядра. Поэтому вирусная репликация подавляется. Устойчивость к адамантанам возникает при заменах аминокислот в белках М2, выстилающих ионный канал. Такие изменения не дают лекарству забить канал.

## 5.2. Ингибиторы нейраминидазы

Занамивир (Relenza) и озельтамивир (Tamiflu), созданные сравнительно недавно с использованием новой технологии структурного драг-дизайна, ингибируют ферментативную активность вирусного поверхностного гликопротеина NA, способного расщеплять нейраминовую компоненту сиаловых кислот в составе рецепторов гемагглютинаина на поверхности клеток.



**Рис. 36.** Структура озельтамивира.

После завершения цикла репликации вирусные частицы должны отпочковаться от клеточной мембраны, с тем чтобы инфицировать новые клетки. Ви-

русная NA необходима для того, чтобы освободить вирусные частицы путем отщепления гемагглютининовых рецепторов, на которые могут залипать дочерние вирусы. Кроме того, высвободившиеся вирусные частицы несут на своей поверхности клеточную мембрану с рецепторами к НА, поэтому вновь отпочковавшиеся вирусы могут образовывать конгломераты. NA отщепляет эти рецепторы гемагглютинина, увеличивая способность вирусов гриппа инфицировать новые клетки дыхательного эпителия. Еще одна функция NA заключается в расщеплении нейраминовых кислот слизи респираторного тракта, что, вероятно, облегчает распространение вируса.

Ингибиторы NA связываются с активным сайтом вирусной NA, блокируя тем самым ее активность. Таким образом, вирусные частицы не могут покинуть поверхность инфицированной клетки, слипаются и не распространяются дальше. Это затрудняет их способность инфицировать новые клетки и сокращает время и тяжесть заболевания. Ингибиторы NA активны как в отношении вирусов гриппа типа А, так и в отношении вирусов типа В. Аминокислоты, которые формируют активный сайт фермента, высококонсервативны для всех 9 известных субтипов NA.

Занамивир и озельтамивир являются производными 2-деокси-2,3-дегидро-N-ацетилнейраминовой кислоты. Однако из-за того, что озельтамивир содержит липофильную группу, которая улучшает биодоступность препарата, его, в отличие от занамивира, можно применять перорально.

Активный поиск новых противогриппозных препаратов среди ингибиторов нейраминидазы продолжается. Попытки разработать второе поколение ингибиторов NA в основном направлены на химически модифицированные и мультимерные формы уже лицензированных препаратов. Эфирные производные занамивира показали *in vitro* возросший противовирусный потенциал, улучшенную биологическую доступность при оральном применении и более высокую эффективность в экспериментах на мышах. Особенно многообещающими являются димерные формы занамивира, которые способны действовать аналогично антителам, связывая вирионы. Димеры со связывающей группой

14 – 18 атомов углерода в длину были в 100 – 1000 раз более эффективны *in vitro*, чем мономерная форма. Период полужизни *in vivo* таких конструкций также существенно увеличился. При интраназальном применении димеры занамивира находятся в легких у мышей более одной недели, и однократная доза препарата, введенная за 7 дней до заражения, предотвращала смерть мышей.

### 5.3. Арбидол

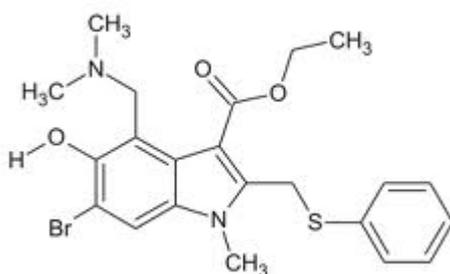


Рис. 37. Структура арбидола.

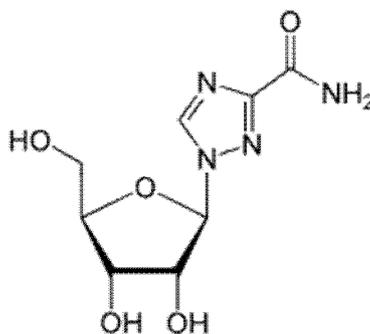
В России широкое распространение получил отечественный препарат арбидол, который с химической точки зрения представляет собой 1-метил-2-фенилметил-3-карбоэтокси-4-(диметиламинометил)-5-окси-6-броминдол гидрохлорид моногидрат. Арбидол рекомендован Фармакологическим комитетом Минздрава России в качестве профилактического и лечебного средства при гриппе А и В, а также при ОРВИ для взрослых и детей. Исследования показали, что высокая эффективность арбидола является результатом разнообразия его биологической активности и обусловлена специфическим действием на вирусную репродукцию, иммуностимулирующим действием, способностью индуцировать интерферон, антиоксидантной активностью. Однако эти результаты пока не нашли подтверждения у зарубежных исследователей.

Показано, что препарат действует на ранние стадии репродукции вируса гриппа. Арбидол взаимодействует с НА вируса гриппа, препятствуя его конформационным изменениям, которые индуцируются низким рН, и, как следствие, ингибирует процесс слияния липидной оболочки вируса с мембранами эн-

досом, приводящий к освобождению вирусного нуклеокапсида и началу транскрипции вирусного генома. Путем многократных пассажей в культуре клеток в присутствии увеличивающихся концентраций арбидола были получены мутанты вируса гриппа, резистентные к нему. При определении нуклеотидной последовательности генов арбидол-резистентных мутантов были найдены мутации только в участке гена, кодирующем HA2. Арбидол-резистентные мутанты имели по одной аминокислотной замене в положениях 27, 42, 51, 87 и 117 HA2, и только один из полученных мутантов имел две замены. Несмотря на широкое использование препарата в России, резистентных к нему эпидемических штаммов вируса гриппа, выделяемых в последние несколько лет, не обнаружено. Также пока не удалось выделить резистентные к арбидолу штаммы от пациентов, принимающих препарат.

Однократная терапевтическая доза арбидола составляет 200 мг, а токсикологические исследования показали безопасность и хорошую переносимость препарата при однократном приеме 1000 мг.

#### 5.4. Рибавирин



**Рис. 38.** Структура рибавирина.

Рибавирин (виразол) является аналогом гуанозина. Применяется при лечении тяжелых случаев гриппа и ОРВИ. Сейчас признают два механизма, по которым рибавирин осуществляет свое противовирусное действие. Во-первых, монофосфат рибавирина действует опосредованно через снижение внутриклеточного уровня ГТФ за счет конкурентного ингибирования инозин 5'-монофосфат дегидрогеназы, а во-вторых, непосредственно через угнетение

функции РНК-полимераз вируса, тем самым нарушая процессы инициации и элонгации вирусных мРНК. Из-за двойственности механизма действия рибавирин способен ингибировать широкий спектр ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Также имеются данные, подтверждающие наличие у препарата иммуномодулирующего действия. Однако последние исследования позволяют предполагать, что основным механизмом, обеспечивающим вирусоспецифическое действие препарата в отношении РНК-содержащих вирусов, связан с мутагенной активностью рибавирина, обуславливающей возникновение летальных мутаций в геноме этих вирусов. До сих пор не выявлены мутанты, резистентные к рибавирину. Однако применение препарата в клинической практике ограничено из-за наличия у него иммунодепрессивного и тератогенного действия.

### **5.5. Лекарственная устойчивость штаммов вируса гриппа**

Давно известные генетические изменения патогенных микроорганизмов при взаимодействии с эффективными антибиотиками и синтетическими химиопрепаратами, ведущие к образованию наследуемых резистентных к лекарству вариантов, распространяются и на вирусы. Исследования более 7500 изолятов показали, что удельный вес штаммов вируса гриппа А/Н3N2, резистентных к адамантанам, чрезвычайно возрос в мире за последние 5 лет и в некоторых странах достигает 60 %. В связи с этим выяснившимся фактом во всех странах мира с 2006 г. действует систематический мониторинг за лекарственной чувствительностью сезонных изолятов. В настоящее время в России среди циркулирующих эпидемических штаммов вирусов гриппа обнаруживается около 20 %, резистентных к нему. Резистентность к препаратам адамантанового ряда обусловлена мутациями в положениях 26, 27, 30, 31 или 34 гидрофобной области М2-белка. Весьма вероятно, что процент резистентных к препаратам адамантанового ряда штаммов по крайней мере в ближайшее время будет увеличиваться во всем мире, и это обстоятельство не позволяет полагаться на амантадин и ремантадин как на единственные препараты для лечения и профилактики гриппа.

При изучении ингибиторов нейраминидазы также уделяется большое внимание поиску возникновения резистентности к ним. Уже показано, что резистентные к ингибиторам нейраминидазы вирусы имеют аминокислотные замены в 119, 152, 274 и 294 положениях ферментативно активного центра нейраминидазы. Трудность формирования мутантов, резистентных к этим препаратам, в культуре клеток (на протяжении от 15 до 20 пассажей) позволяла надеяться на то, что такие штаммы не будут широко распространены. Это отчасти подтверждалось тем, что среди более 1000 клинических изолятов, собранных ВОЗ в различных частях мира в 1996 – 1999 гг. до применения ингибиторов нейраминидазы, не было обнаружено ни одного изначально обладающего резистентностью к ним. Однако при применении озельтамивира у больных гриппом детей было выделено 16 % резистентных к нему изолятов. В эпидемический сезон 2007 – 2008 гг. среди изолятов вируса гриппа субтипа H1N1, протестированных в 18 европейских странах, 59 (13,5 %) из 437 были резистентны к озельтамивиру и имели замену гистидина на тирозин в 274 положении NA. В Японии процент озельтамивир-резистентных штаммов A/H1N1 в сезон 2007 – 2008 гг. составлял 0,4 %, а в сезон 2008 – 2009 гг. поднялся до 100 %, но все штаммы сохранили чувствительность к занамивиру и адамантанам. Все штаммы имели аминокислотную замену в белке NA H274Y.

Резистентность к озельтамивиру среди штаммов вируса гриппа субтипа H1N1 главным образом встречается среди представителей клады 2В (A/Brisbane/59/2007-подобные), в то время как адамантан-резистентный фенотип чаще встречается среди вирусов, принадлежащих к кладе 2С (A/Hong Kong/2652/2006-подобные). Однако были выявлены вирусы субтипа H1N1, которые вследствие процессов реассортации и спонтанных мутаций приобрели резистентность как к озельтамивиру, так и к адамантанам.

**Таблица 5.** Мутации в белках вируса гриппа, отвечающие за резистентность к противогриппозным препаратам.

Фенотип штамма вируса гриппа	Адамантаны	Арбидол	Озельтамивир
------------------------------	------------	---------	--------------

	M2-белок					HA2- субъединица HA				NA			
	aa 26	aa 27	aa 30	aa 31	aa 34	aa 27	aa 42	aa 51	aa 117	aa 119	aa 274	aa 292	aa 294
резистентный	I/F	A/I	T/S	N	E	H	N	R	N	V	Y	K	S
чувствительный	L	V	A	S	G	Q	Q	K	K	E	H	R	N

В любом случае возникновение штаммов, устойчивых к озельтамивиру, наблюдается реже, чем к адамантанам, а штаммов вируса гриппа, резистентных к арбидолу, вообще до сих пор не выявлено.

Формирование лекарственно-резистентных вариантов вируса является фактором отрицательного значения при массовом использовании определенного лечебно-профилактического препарата против возбудителя, непрерывно циркулирующего среди населения, подобно вирусам гриппа. Такие препараты приходится периодически заменять новыми, к которым указанные вирусы еще не приобрели лекарственной устойчивости. Систематический мониторинг за лекарственной устойчивостью вирусов гриппа дает возможность отследить распространение резистентных вариантов и дать своевременные рекомендации по назначению противогриппозных препаратов, а в перспективе выяснить механизмы распространения резистентных вариантов в вирусной популяции и найти пути преодоления этих явлений.

### **5.6. Комбинированная терапия**

Использование комбинации противовирусных препаратов с различными механизмами действия может увеличить эффективность лечения тяжелых случаев заболевания. Это происходит за счет аддитивного или синергичного подавления вирусной репликации. Помимо этого, комбинированная терапия дает возможность снизить вводимую дозу для каждого препарата, что способствует уменьшению токсичности лекарственных средств и частоты развития побочных эффектов. Использование комбинации препаратов дает также и такое существенное преимущество, как снижение частоты появления резистентных вирусных мутантов. Пассирование вирусов H1N1, H3N2 и H5N1 в присутствии амантадина или озельтамивира приводило к возникновению лекарственно-устойчивых штаммов, но когда процедуру проводили в присутствии обоих ле-

карственных препаратов, не было отмечено изменений в чувствительности вирусов. При тестировании ремантадина совместно с занамивиром, озельтамивиром или перамивиром все три комбинации оказывали синергичное подавляющее действие на размножение изолятов вирусов гриппа H1N1 и H3N2-подтипов. В опытах на мышах, инфицированных вирусом H5N1-подтипа, чувствительным к озельтамивиру и амантадину, комбинированная терапия приводила к аддитивному эффекту: озельтамивир способствовал 30 %-ной выживаемости мышей, амантадин – 60 %-ной, а их комбинация вызывала увеличение жизнеспособности инфицированных животных до 90 %. Комбинированная терапия также существенно снижала титр вируса в легких и препятствовала его распространению в головной мозг.

В единственном опубликованном исследовании на людях лечение тяжелого сезонного гриппа комбинацией ремантадина с занамивиром было более эффективным по сравнению с использованием одного ремантадина. Принимая во внимание то, что в данный момент в стадии разработки находится значительное количество противогриппозных препаратов, можно предположить, что в ближайшем будущем появятся новые комбинации лекарственных средств.

Существование обширного резервуара вирусов гриппа А в диких водоплавающих и околоводных птицах, а также способность вируса преодолевать межвидовые барьеры означает, что они никогда не будут уничтожены и всегда будут представлять угрозу здоровью человека и домашних животных. Доступные в настоящее время стратегии противовирусной терапии были разработаны скорее с целью уменьшения последствий сезонного гриппа, чем для борьбы с угрожающим жизни заболеванием. Однако появление высококовирулентного вируса гриппа А/H5N1-подтипа, вызывающего гибель 60 % инфицированных людей, заставило более серьезно отнестись к проблеме гриппа. Необходимы новые, более эффективные лекарственные препараты как для борьбы с новыми пандемическими штаммами вируса гриппа, так и для снижения потерь от сезонного гриппа. Есть основания надеяться на то, что попытки, предпринимаемые в настоящее время учеными в этом направлении, окажутся успешными.

***Рекомендуемая литература.***

*Hay A.* Amantadine and rimantadine-mechanisms // *Antiviral Drug Resistance* / Ed. D. Richman. – Chichester, 1996. – P. 44 – 58.

*Leneva I. A., Russell R. J., Boriskin Y. S. Hay A. J.* Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol // *Antiviral Research*. – 2009. – V. 81(2). – P. 132 – 140.

*McKimm-Breschkin J., Trivedi T., Hampson A., Hay A., Klimov A., Tashiro M., Hayden F., Zambon M.* Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2003. – V. 47(7). – P. 2264–2272.

*Stiver G.* The treatment of influenza with antiviral drugs // *Canadian Medical Association Journal*. – 2003. – V. 1689(1). – P. 49–57.

## ГЛАВА 6. РАЗМНОЖЕНИЕ И ТИТРОВАНИЕ

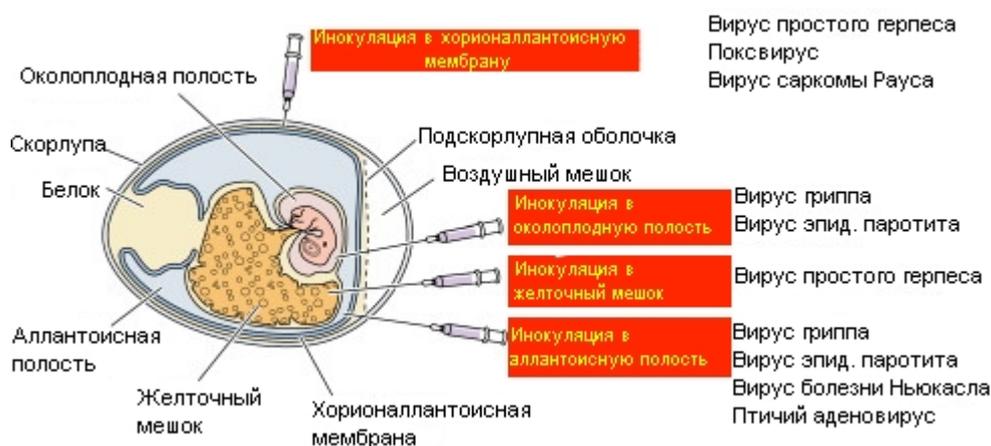
### 6.1. Выращивание вируса гриппа в куриных эмбрионах



**Рис. 39.** Культивирование вируса гриппа в куриных эмбрионах.

Вирусы гриппа А, как правило, хорошо культивируются в развивающихся куриных эмбрионах. Большая часть противогриппозных вакцин, как инактивированных, так и живых, производится именно на куриных эмбрионах.

Рис. 40 демонстрирует разрез куриного яйца с развивающимся эмбрионом. Показаны различные пути инокуляции в яйцо, так же как и различные части эмбриона, в которых размножаются вирусы.



**Рис. 40.** Структурные части десятидневного куриного эмбриона и пути введения вирусного материала.

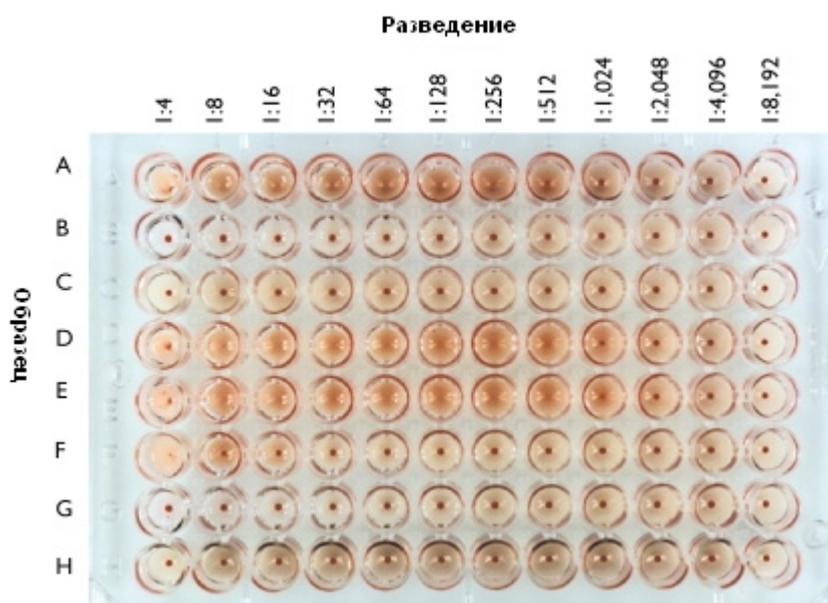
Для размножения вируса гриппа используются свободные от патогенов 10 – 11-дневные куриные эмбрионы. Яйцо располагают перед источником света для определения области аллантоисной полости без прожилок, расположенной под воздушным мешком. Она помечается карандашом. После того как все яйца просвечены таким образом, в скорлупе делается небольшое отверстие стерильным шилом. После этого в яйца вводится вирус при помощи шприца для инъекций туберкулина – шприц на 1 мл, заполненный наполовину. Игла проходит через отверстие в скорлупе, сквозь хорион-аллантоисную мембрану, и вирус

инъецируется в аллантоисную полость, заполненную аллантоисной жидкостью. Отверстие в скорлупе запечатывается расплавленным парафином, и яйца помещают на 48 часов в термостат, установленный на 37°C.

В течение инкубационного периода вирус размножается в клетках хорионаллантоисной мембраны, новые вирусные частицы выходят в аллантоисную жидкость. Чтобы собрать вирус, удаляют верхушку яичной скорлупы – часть, покрывающую воздушный мешок, подскорлупная оболочка и хорионаллантоисная мембрана протыкаются пипеткой, и собирается аллантоисная жидкость – примерно 9 – 10 мл с каждого яйца.

## **6.2. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)**

Чтобы понять метод торможения гемагглютинации, сначала нужно рассмотреть реакцию гемагглютинации. Гемагглютинин вируса гриппа может прикрепляться не только к эпителиальным клеткам, но также к эритроцитам человека, кур, морской свинки и других млекопитающих, вызывая образование своеобразной решетки, поскольку один вирус может связаться с двумя эритроцитами. Это свойство вирусов гриппа называется гемагглютинацией. Для проведения анализа готовятся двукратные последовательные разведения вируса, смешиваются с определенным количеством эритроцитов и добавляются в лунки планшета с U- или V-образным дном. Эритроциты, которые не связались вирусом гриппа, оседают на дно лунки и образуют «пуговицу». Эритроциты, прикрепившиеся к вирусным частицам, образуют решетку, покрывающую лунку, и получается «зонтик». Анализ занимает не более 30 минут и поэтому часто используется в лабораториях для определения относительных количеств вирусных частиц в свежеприготовленной вирусосодержащей аллантоисной или культуральной жидкости. Подсчитано, что 1 гемагглютинирующая единица (ГАЕ) вируса – последний «зонтик» в реакции гемагглютинации – содержит приблизительно  $10^6$  вирусных частиц.



**Рис. 41.** Реакция гемагглютинации.

На рис. 41 показаны подготовленные двукратные разведения образцов различных вирусов гриппа (А – Н) с добавленными эритроцитами петуха в лунках 96-луночного планшета. Спустя 30 минут после добавления эритроцитов лунки сфотографировали. Образец А вызвал гемагглютинацию до разведения 1:256, поэтому титр НА этого образца составил 256 ГАЕ, образцы в рядах D и E имеют титры НА, равные 512 ГАЕ. Образцы в рядах B, C, F, G и H либо не содержат вируса гриппа, либо его в пробе меньше, чем  $10^6$  вирусных частиц.

Реакция торможения гемагглютинации позволяет определить уровень антител к вирусу гриппа в образцах сыворотки. Вначале получают препарат вируса гриппа, например, A/California/04/2009, определяют его титр в реакции гемагглютинации, физиологическим раствором доводят титр вируса до 4 или 8 ГАЕ. Затем готовят двукратные разведения каждой сыворотки в 96-луночном планшете, вносят равный объем приготовленного вируса, выдерживают при  $30^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа и вносят равный объем эритроцитов, инкубируют полчаса.

Суть реакции торможения гемагглютинации в том, что антитела к вирусу гриппа препятствуют прикреплению вируса к эритроцитам. Поэтому, если в сыворотке есть антитела к данному или родственному штамму и если их количество достаточно для связывания 4 ГАЕ вируса, гемагглютинация подавляется

в присутствии сыворотки. В этом случае гемагглютинации в лунках наблюдаться не будет, пока разведение сыворотки не приведет к такому разбавлению антител, что их будет недостаточно для торможения гемагглютинации. Наивысшее разведение сыворотки (наименьшая концентрация антител), останавливающее гемагглютинацию, называется титром сыворотки в РТГА. Известно, что титры антител в РТГА, равные 1:40, приводят к снижению риска инфицирования гриппом в популяции как минимум на 50 %.

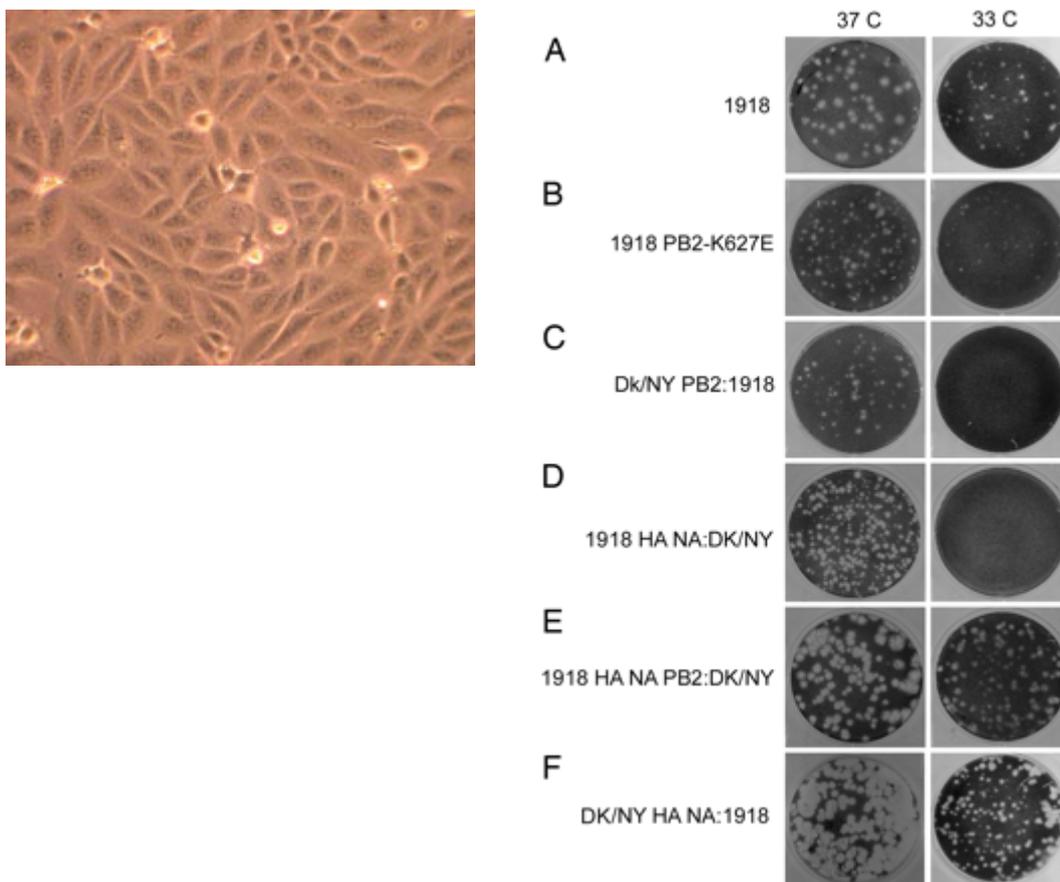
***Рекомендуемая литература.***

*Katz J., Hancock K., Veguilla V., Zhong W., Lu Xh., Sun H., Butler E., Dong L., Liu F., Li Zn., DeVos J., Gargiullo P., Cox N.* Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine // *Morbidity and Mortality Weekly Report.* – 2009. – V. 58(19). – P. 521–524.

### **6.3. Микронеutralизация вируса гриппа**

Микронеutralизация – метод, с помощью которого определяют титр нейтрализующих антител в сыворотках.

Репликация вируса часто исследуется в лаборатории путем инфицирования чувствительных клеточных культур. На рис. 42 – пример клеток MDCK, зараженных реассортантами вируса гриппа А/Н1N1, вызвавшего пандемию в 1918 г.



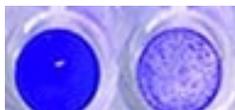
**Рис. 42.** Клетки MDCK, нативные (слева) и инфицированные различными реассортантами вируса гриппа A/H1N1 и исходным штаммом 1918 (справа). Инкубация проводилась при 37°C или 33°C в течение 48 часов.

Источник: *Van Hoesen N., et al.* Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2009. – V. 106(9). – P. 3367.

На рис. 42 фотография слева – это неинфицированные клетки MDCK, а справа – состояние клеточного монослоя через 48 часов после заражения вирусом. Пораженные клетки погибают не сразу: сначала у них меняется форма, они округляются, в цитоплазме наблюдаются новые образования, и в конце концов они отделяются от поверхности планшета. Все видимые изменения в клетках, вызванные вирусом, называются цитопатическим эффектом.

Самый наглядный способ увидеть уничтожение клеток вирусом, не используя микроскоп, это окрасить клетки красителем. На рис. 43 клетки были выращены в лунках 6-луночного планшета. В правую лунку добавили вирус, а в левую – нет. После периода инкубации клетки окрасили кристаллическим фиолетовым.

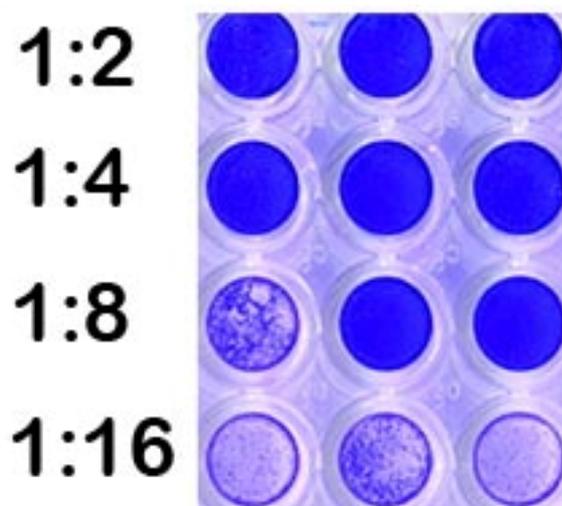
Этот визуальный метод можно использовать для определения того, способна ли сыворотка нейтрализовать вирусное заражение. Если сыворотка содержит нейтрализующие антитела, тогда клетки выживут, как показано на рис. 43 (левая лунка). Если нейтрализующие антитела отсутствуют в сыворотке, то клетки погибнут (правая лунка).



**Рис. 43.** Нативные и зараженные клетки, окрашенные кристаллвиолетом.

Источник: *Hatakeyama S., et al.* Enhanced expression of an  $\alpha$ 2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2005. – V. 43(8). – P. 4139–4146.

В описанном виде результаты данного анализа говорят только о том, имеются ли нейтрализующие антитела в сыворотке или нет. Чтобы сделать данный анализ количественным, готовят двукратные разведения сыворотки, и каждое разведение смешивают со строго определенным количеством вируса, после чего смесь используется для заражения клеток. При низких разведениях сыворотки антитела будут блокировать инфекцию, а при максимальных разведениях количества антител окажется недостаточным, чтобы проявился эффект. Титр сыворотки в реакции нейтрализации выражается как наибольшее разведение сыворотки, при котором блокируется вирусная инфекция.



**Рис. 44.** Реакция микронеutralизации (в 96-луночном культуральном планшете).

На рис. 44 показано, как сыворотка полностью блокирует вирусную инфекцию в разведениях 1:2 и 1:4. В меньшей степени нейтрализующий эффект

проявляется при разведении 1:8 и отсутствует в разведении 1:16. Каждое разведение сыворотки тестировалось трижды для большей точности. В данном случае титр в реакции нейтрализации составляет 1:4 – последнее разведение сыворотки, при котором инфекция блокирована полностью.

Эпидемиологические наблюдения показали: если в человеческой популяции титры антител в РТГА против данного штамма вируса равны 1:40, то риск заражения снижается как минимум на 50 %. Исследования, проведенные CDC в отношении титров антител в микронеutralизации, подобной корреляции не выявили. Было обнаружено, что сыворотки от детей с титром в РТГА 1:40 соответствовали титрам микронеutralизации 1:40. Однако у взрослых титр в РТГА 1:40 соответствовал титру в микронеutralизации 1:160 и выше. Причина такого различия неясна, но возможно, что не все нейтрализующие антитела в сыворотке взрослых способны подавлять гемагглютинацию.

#### ***Рекомендуемая литература.***

*Katz J., Hancock K., Veguilla V., Zhong W., Lu Xh., Sun H., Butler E., Dong L., Liu F., Li Zn., DeVos J., Gargiullo P., Cox N.* Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine // *Morbidity and Mortality Weekly Report.* – 2009. – V. 58(19). – P. 521–524.

#### **6.4. Титрование вирусов: метод получения бляшек**

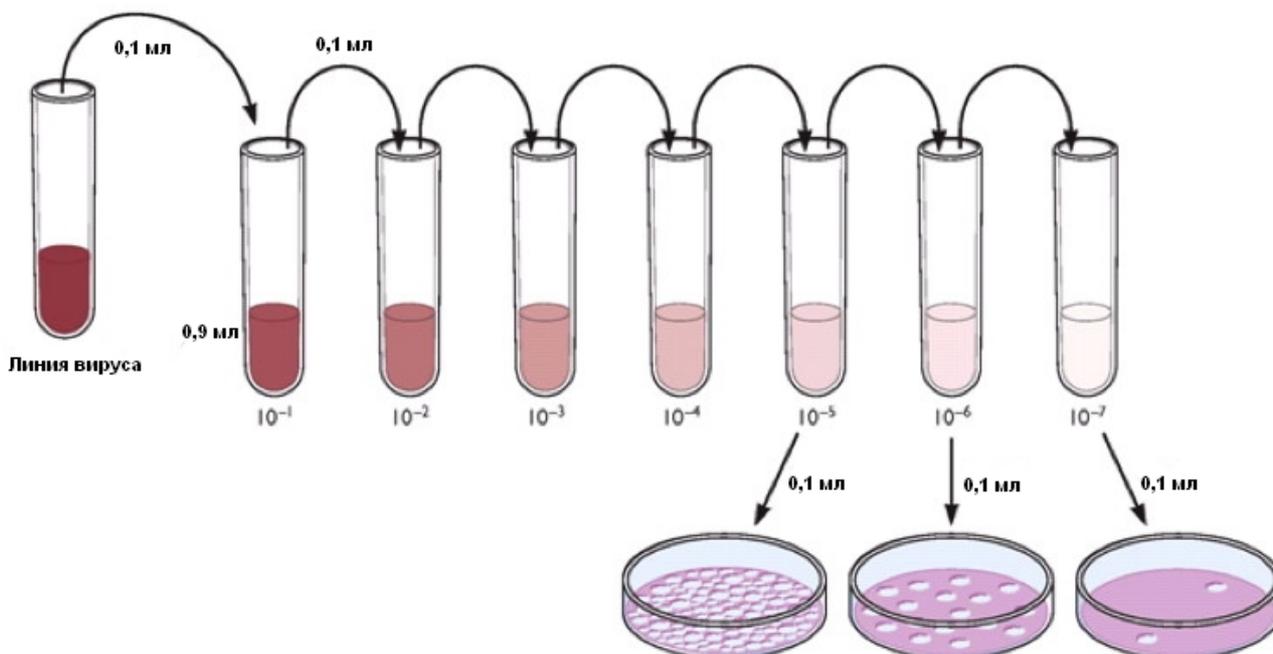
Широко используемый подход для определения количества инфекционного вируса – это подсчет бляшкообразующих единиц. Данная методика впервые была разработана для подсчета титров бактериофагов. Профессор Р. Дульбекко модифицировал этот процесс в 1952 г. для использования в изучении вирусов животных, и с тех пор он используется для надежного определения титров многих вирусов.



**Рис. 45.** Бляшки, образованные вирусом птичьего гриппа в культуре клеток MDCK.

Для проведения экспериментов по бляшкообразованию готовят 10-кратные разведения вируса и вносят 0,1 мл аликвоты в монослой чувствительных клеток. После инкубационного периода, соответствующего времени адсорбции вируса на клетках, монослой покрывается питательной средой, содержащей полужидкий агар. Планшеты инкубируют, в зараженных клетках нарабатывается вирусное потомство, но благодаря верхнему слою агара распространение новых вирусов возможно только до соседних клеток. В итоге каждая инфекционная частица производит круговую зону зараженных клеток, называемую бляшкой. Через 3 – 4 суток бляшка становится достаточно большой, чтобы стать видимой невооруженным глазом. Краситель, окрашивающий только живые клетки, используется для усиления контраста между живыми клетками и бляшками. Этот способ пригоден для анализа только тех вирусов, которые вызывают гибель клеток или заметное цитопатическое действие. Пример бляшек, образованных вирусом птичьего гриппа на монослой клеток MDCK, показан на рис. 45. Клетки окрашены кристаллическим фиолетовым, и бляшки без труда видны там, где клетки разрушены вирусной инфекцией.

Титр вируса может быть подсчитан в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на миллилитр. В целях снижения погрешности подсчитываются только планшеты, содержащие в лунках от 10 до 100 бляшек, в зависимости от размера используемого планшета с культурой клеток. Согласно данным статистики, при подсчете 100 бляшек ошибка титра будет варьироваться в пределах  $\pm 10\%$ . Для повышения точности метода каждое разведение исследуется дважды. На рис. 46 показано 17 бляшек на чашке, засеянной из разведения  $10^{-6}$ . Поэтому титр вируса составит  $1,7 \times 10^8$  БОЕ/мл.



**Рис. 46.** Титрование вируса методом бляшкообразования.

***Рекомендуемая литература.***

*Dulbecco R., Vogt M.* Some problems of animal virology as studied by the plaque technique // Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. – 1953. – V. 18. – P. 273–279.

**Сколько вирусов требуется для образования бляшки?**

Анализ бляшкообразования – главный инструмент для определения титра вируса. Подсчитывая количество бляшек, можно вычислить титр вируса в БОЕ на миллилитр. Основной вопрос: сколько нужно вирусов для формирования одной бляшки?

Для большинства вирусов животных одной инфекционной частицы бывает достаточно для начала инфекции. К этому выводу можно прийти, изучая соотношения между количеством вирусных частиц и подсчетом бляшек. Линейная зависимость означает, что бляшку может образовать одна инфекционная частица.

Если единичная вирусная частица способна образовать бляшку, то вирусное потомство внутри бляшки представляет собой клоны. Вирусная линия, приготовленная из одной бляшки, называется чистой культурой вируса. Чтобы приготовить такую культуру, наконечник пипетки вставляют в верхний слой

агара над бляшкой. Пробка агара удаляется и помещается в буферный раствор. Вирусы из агара переходят в буферный раствор, который затем можно использовать для заражения клеточных культур. Для обеспечения чистоты этот процесс бляшкообразования обычно повторяют еще дважды. Получение чистых культур вирусов было важным шагом, позволившим проводить генетический анализ вирусов.

### **6.5. Титрование вирусов методом предельных разведений**

Анализ бляшкообразования является эффективным методом определения титра вируса, однако к некоторым вирусам он неприменим. Вирус гриппа человека также сложно выращивать в бляшках, и в рутинной работе обычно пользуются методом предельных разведений. Этим методом измеряли титры вирусов еще до появления метода бляшкообразования и до сих пор применяют его для всех вирусов, не образующих бляшек.

При проведении методики сначала готовят последовательные разведения вируса, затем вносят определенное количество каждого разведения в лунку с культурой клеток, причем часто используют для этого 96-луночные планшеты. Инкубируют 5 – 7 суток и определяют количество лунок, в которых наблюдается цитопатический эффект.

В примере, показанном в табл. 6, по 10 лунок с клеточным монослоем были инфицированы разведениями вируса. После инкубационного периода лунки, в которых наблюдали цитопатический эффект, были помечены знаком плюс. При высоких разведениях вируса ни одна из клеточных культур не была заражена. При низких разведениях каждая лунка с культурой клеток была инфицирована. При разведении  $10^{-5}$  в половине лунок наблюдали цитопатический эффект. Это и есть конечная точка: разведение вируса, при котором 50 % клеточных культур оказалось заражено. Это количество может быть высчитано на основании данных и выражено как 50 %-ная инфекционная доза ( $ID_{50}$ ) на мл. Линия вирусов в приведенном примере содержит  $10^5$   $ID_{50}$  на мл.

**Таблица 6.** Определение 50 %-ной инфекционной дозы ( $ID_{50}$ ) на миллилитр.

Разведение вируса	Цитопатический эффект									
$10^{-2}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-3}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-4}$	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-5}$	–	+	+	–	+	–	–	+	–	+
$10^{-6}$	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
$10^{-7}$	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

В реальной жизни очень редко какое-то разведение вируса вызывает цитопатический эффект строго в 50 % лунок. Поэтому привлекаются статистические методы подсчета конечной точки титрования.

Метод предельного разведения также может использоваться при определении вирулентности вируса у животных. Применяется тот же подход: готовят последовательные разведения вируса и вводят в ряд подопытных животных. Заражение животного можно определить по его смерти или клиническим симптомам, таким как повышенная температура, потеря веса и др. Результаты выражаются в виде 50 %-ной летальной дозы ( $LD_{50}$ ) на мл. Например, каждое разведение вируса от  $10^{-2}$  до  $10^{-7}$  вводили восьми мышам. Для определения  $LD_{50}$  на мл использовали статистический метод Рида – Менча (табл. 7). Конечная точка в 50 %, которая находится между пятым и шестым разведениями, подсчитана как  $10^{-6,5}$ . Получается, что образец вируса содержит  $10^{6,5} LD_{50}$  в миллилитре.

**Таблица 7.** Определение 50 %-ной летальной дозы ( $LD_{50}$ ) на мл.

Разведение	Выжило	Умерло	Всего выжило	Всего умерло	Показатель смертности	Смертность (%)
$1 \times 10^{-2}$	0	8	0	40	0/40	100
$1 \times 10^{-3}$	0	8	0	32	0/32	100
$1 \times 10^{-4}$	1	7	1	24	1/25	96
$1 \times 10^{-5}$	0	8	1	17	1/18	94
$1 \times 10^{-6}$	2	6	3	9	3/12	75
$1 \times 10^{-7}$	5	3	8	3	8/11	27

**Рекомендуемая литература.**

*Reed L. J., Muench H.* A simple method of estimating fifty percent endpoints // *American Journal of Hygiene.* – 1938. – V. 27. – P. 493–497.

## СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- CDC – Центр контроля заболеваемости
- HA – гемагглютинин
- HEF – hemagglutinin-esterase-fusion
- HPAI – высокопатогенный птичий грипп
- IFN – интерферон
- Ig – иммуноглобулин
- IL – интерлейкин
- LD – летальная доза
- MDA –
- MDCK –
- NA – нейраминидаза
- RIG – рецептор распознавания образа
- TLR – толл-подобные рецепторы
- БОЕ – бляшкообразующая единица
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- вРНК – вирусная РНК
- ГАЕ – гемагглютинирующая единица
- ГТФ –
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИД – инфекционная доза
- мРНК –
- ОРВИ – острые респираторные вирусные инфекции
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РНП – рибонуклеопротеин
- РТГА – реакция торможения гемагглютинации
- ФНО – фактор некроза опухоли