

**ГБОУ ВПО “Уральская государственная медицинская академия”  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии**

**Методические указания №26 к практическим занятиям для студентов**

ООП специальности 060101.65 Лечебное дело  
Дисциплина С2.Б.10 Микробиология, вирусология

**1. Тема: Ортомиксовирусы. Вирус гриппа.**

**2. Цели занятия:** Изучить со студентами строение ортомиксовирусов, свойства возбудителей гриппа, патогенез гриппа, методы диагностики, профилактики и лечения гриппа.

**3. Задачи занятия:**

3.1. Изучение строения и классификации ортомиксовирусов.

3.2. Изучение свойств вирусов гриппа.

3.3. Изучение патогенеза, диагностики, профилактики и лечения гриппа.

3.4. Выполнение самостоятельной работы.

Шифр	Содержание компетенции	знать	уметь	владеть
ПК-7	Способность и готовность применять методы асептики и антисептики, использовать медицинский инструментарий, проводить санитарную обработку лечебных и диагностических помещений медицинских организаций, владеть техникой ухода за больными	Структуру ортомиксовирусов	Формулировать принципы профилактики гриппа	Техникой постановки реакции агглютинации
ПК-20	Способность и готовность назначать больным адекватное (терапевтическое и хирургическое) лечение в соответствии с выставленным диагнозом, осуществлять	Принципы лабораторной диагностики гриппа	Применять элементы методик вирусологических исследований в лабораторной практике	Техникой постановки реакции агглютинации

	алгоритм выбора медикаментозной и немедикаментозной терапии больным с инфекционными и неинфекционными заболеваниями, к ведению физиологической беременности, приему родов			
ПК-31	Способность и готовность изучать научно-медицинскую информацию, отечественный и зарубежный опыт по тематике исследования	Методы выделения вирусов	Работать с учебной и научной литературой	Вирусологическим понятийным аппаратом

4. **Продолжительность занятия в академических часах:** 3 часа.

5. **Контрольные вопросы по теме:**

- 5.1. Структура и классификация ортомиксовирусов.
- 5.2. Строение вируса гриппа.
- 5.3. Патогенез, диагностика, профилактика и лечение гриппа.

6. **Задания и методические указания к их выполнению.**

На занятии студенту необходимо выполнить:

- 6.1. Ответить на вопросы преподавателя.
- 6.2. Принять участие в обсуждении изучаемых вопросов.
- 6.3. Выполнить самостоятельную работу.

**Теоретическая справка**

#### **Общая характеристика ортомиксовирусов**

Семейство *Orthomyxoviridae* (от греч. *orthos* - правильный, прямой и *муха* - слизь) объединяет группу вирусов, которые имеют особое сродство к мукополисахаридам и гликопротеидам клеточных рецепторов, а также сходные биологические свойства.

**Классификация.** Согласно международной таксономии вирусов, семейство *Orthomyxoviridae* включает четыре рода: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* и *Togotovirus*.

**Род *Influenzavirus A*** включает один вид - вирус гриппа А. Этот вирус открыли В. Смит, С. Эндрюс и П. Лейдлоу в 1933 г. Внутри этого вида различают субтипы вируса по гемагглютиниону и нейраминидазе. Внутри субтипов могут быть сероварианты. Номенклатура вновь выделенных изолятов вируса гриппа А складывается из следующих критериев: род / хозяин / место выделения /

обозначение штамма / год выделения / формула (тип гемагглютинина Н и нейраминидазы N), например, А/крачка/ Южная Африка/1/61/(H5N3).

**Род *Influenzavirus В*** включает один вид - вирус гриппа В, который выделили Т. Фрэнсис и Р. Меджилл в 1940 г. У него не установлены антигенные субтипы. Вирусы гриппа В обозначаются по следующим критериям: род / место выделения / обозначение штамма / год выделения.

**Род *Influenzavirus С*** также включает один вид - вирус гриппа С, который открыл Р. Тэйлор в 1947 г. Данный вид инфицирует только людей. Антигенных субтипов у вируса гриппа С не отмечено. Чаще всего вирусы гриппа С вызывают инфекцию у детей в виде отдельных спорадических вспышек.

**Род *Togotovirus*** включает 2 вида. Тоготовирусы передаются между позвоночными через клещей.

**Морфология вирионов.** Геном ортомиксовирусов представлен односпиральной линейной фрагментированной молекулой минус-РНК. Количество фрагментов в геноме различных представителей ортомиксовирусов разное. Так, вирусы гриппа А и В имеют по 8 фрагментов, вирусы гриппа С – 7 фрагментов; тоготовирусы - 6 фрагментов. Каждый фрагмент в отдельности и все фрагменты в совокупности покрыты белковой оболочкой, образуя нуклеокапсид. Снаружи вирион ортомиксовирусов покрыт суперкапсидной оболочкой, имеющей шипы, образованные гемагглютинином и нейраминидазой. Между нуклеокапсидом и суперкапсидом располагается матриксный белок М. Нуклеокапсид с М-белком в совокупности составляют сердцевину вириона.

**Устойчивость.** Ортомиксовирусы слабо устойчивы во внешней среде. Под действием ультрафиолетового света они погибают в течение 5 минут. В 70%-ном этиловом спирте вирусы гибнут через 5 минут, в 3%-ном феноле, 1%-ной настойке йода, 1%-ной сулеме, 1%-ном купоросе – через 3 минуты.

### **Вирус гриппа**

**Морфология.** Вирионы вируса гриппа имеют сферическую форму, размером 80-120 нм, содержат 32 капсомера. Вирионы ортомиксовирусов состоят из нуклеокапсидной спиральной симметрии и липопротеидной оболочки (суперкапсид), которая имеет выступы, образованные из гемагглютинина и нейраминидазы. Между нуклеокапсидом и суперкапсидом располагается М-белок.

**Геном** вируса гриппа образован однонитевой спиральной молекулой минус-РНК. Геном состоит из отдельных фрагментов. Каждый фрагмент вирусной РНК покрыт отдельным белком. РНК упакована в комплексе с белками в виде спирали, составляя нуклеокапсид.

**Нуклеокапсид** имеет спиральный тип симметрии. Он представляет собой рибонуклеопротеиновый (РНП) тяж (РНК, связанная с капсидными белками), уложенный в виде двойной спирали, которая составляет сердцевину вириона.

**Серцевина** окружена мембраной, состоящей из белка М, который соединяет РНП с двойным липидным слоем внешней оболочки (суперкапсидом) и шиповидными отростками гемагглютинина и нейраминидазы.

**Суперкапсид** образован липидным бислоем, который пронизывают гликопротеиновые шипы.

В вирионе обнаружено 7 структурных белков, из которых 3 белка являются наружными и 4 белка - внутренними.

**К наружным структурным протеинам** относятся гемагглютинин (H), нейраминидаза (N) и белок М. Гемагглютинин и нейраминидаза входят в состав суперкапсида. Они закорены гидрофобными концами в липидном бислое суперкапсида и структурно оформлены в виде шипов, выступающих на поверхности вириона. Внутри вириона гемагглютинин и нейраминидаза контактируют с М-белком, а через него - с сердцевинной.

**Гемагглютинин** и нейраминидаза являются гликопротеинами и входят в состав липопротеиновой оболочки вириона (суперкапсида). Гемагглютинин изменчив (у вирусов гриппа А человека и животных выявлено 16 антигенных типов или вариантов гемагглютинина – от Н1 до Н16). Антитела к нему обеспечивают защитный эффект.

Функции гемагглютинина:

- прикрепительная (связывание с сиаловой кислотой рецепторов поверхности эпителиальных клеток);
- участие в слиянии оболочки вириона с мембранами клетки и гемагглютинации (склеивании эритроцитов);
- протективные свойства, способствующие развитию иммунитета (вируснейтрализующие антитела).

**Нейраминидаза** распознает и взаимодействует с рецепторами клетки, содержащими N-ацетилнейраминовую кислоту, то есть приводит к проникновению вируса внутрь клетки, а также, отщепляя нейраминовую кислоту от дочерних вирионов и клеточной мембраны, способствует выходу вирусов из клеток и распространению вирионов. Нейраминидаза изменчива – у вируса гриппа А человека и животных выявлено 9 вариантов нейраминидазы (от N1 до N9). У вируса гриппа типа С нейраминидаза отсутствует; ее заменяет ацетилэстераза.

Нейраминидаза образует отдельные шипы, которых меньше, чем количество шипов гемагглютинина. Нейраминидаза отделяет вирионы от сиалированных муцинов, покрывающих слизистую оболочку, способствуя продвижению вируса к поверхности эпителиальных клеток. При завершении репликативного цикла она помогает отделению созревших вирионов от эпителиальных клеток.

**Протеин М** (матриксный белок) выстилает липопротеиновую оболочку изнутри вирусной частицы. Он представлен белками М1 и М2, которые окружают нуклеокапсид и защищают геном. При этом М1-белок взаимодействует с нуклеокапсидом и оболочкой, а М2-белок формирует мембранный канал.

**Три внутренних структурных протеина** (РВ1, РВ2, РА) формируют нуклеокапсид, а также участвуют в транскрипции и репликации вируса. Так, белки Р1 или РВ1 являются транскриптазой, Р2 или РВ2 – эндонуклеазой, Р3 или РА – репликазой. **Четвертый внутренний белок** (NР) связан с наружным фрагментом РНК и выполняет регуляторные и структурные функции.

Кроме структурных белков для вируса гриппа характерны **неструктурные белки** NS1 и NS2, существующие только в инфицированной клетке.

**Репродукция** вируса гриппа состоит из следующих этапов:

1. **Адсорбция и проникновение вируса внутрь клетки.** Вирус адсорбируется на клетках за счет взаимодействия гемагглютинина с сиаловой кислотой рецепторов клеточных мембран и проникает внутрь.

2. **Депротенизация капсида и его проникновение в ядро клетки.** В цитоплазме клетки нуклеокапсид освобождается от суперкапсида и выходит в цитоплазму. Отсюда вместе с М-белком он транспортируется в ядро, где уже через несколько минут после заражения появляются первые РНК-транскрипты.

3. **Образование полных и неполных плюс-нитей РНК.** В ядре клетки происходит трансформация геномной минус-нити РНК с помощью вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы в неполные и полные плюс-нити. Неполные плюс-нити являются иРНК для синтеза вирусных белков, а полные плюс-нити служат матрицей для синтеза геномных минус-нитей РНК.

4. **Трансляция вирусных белков.** После выхода молекул мРНК из ядра в цитоплазму клетки происходит трансляция вирусных белков (NP, PB1, PB2, PA и М) на полирибосомах. Белки NP, PB1, PB2 и PA после синтеза из цитоплазмы возвращаются в ядро, где связываются с вновь синтезированной вирусной РНК, а затем в виде нуклеокапсида возвращаются в цитозоль.

Матриксный белок М после синтеза в цитоплазме движется к внутренней поверхности клеточной мембраны, вытесняя из нее в этом участке клеточные белки.

Белки N и N синтезируются на рибосомах, связанных с мембранами эндоплазматического ретикулума, подвергаются гликозилированию и транспортируются на внешнюю поверхность клеточной мембраны, встраиваясь напротив белка М и образуя шипы. Белок N при этом подвергается разрезанию на субъединицы NA1 и NA2.

5. **Формирование потомства вирионов.** На границе ядерной мембраны белки капсида и РНК потомства формируют нуклеокапсиды, которые мигрируют в цитоплазму для дальнейшего созревания. В модифицированных М-белком участках клеточной мембраны нуклеокапсиды окончательно созревают и выходят из клеток путем почкования.

6. **Выход вирионов из клетки** происходит почкованием. При этом сформированный нуклеокапсид, проходя через мембрану клетки, окружается белком М и измененной мембраной клетки, содержащей гемагглютинин и нейраминидазу.

### **Вирус гриппа А.**

**Эпидемиология.** Источник инфекции - только человек, больной или носитель. Заражение происходит воздушно-капельным путем. Инкубационный период очень короткий, возникшая эпидемия распространяется очень быстро и при отсутствии коллективного иммунитета может перерасти в пандемию.

**Особенности патогенеза и клиники.** Инкубационный период при гриппе короткий - 1-2 суток. Вирус размножается в эпителиальных клетках слизистой оболочки дыхательных путей с преимущественной локализацией в области трахеи, что клинически проявляется в виде сухого мучительного кашля с болями по ходу трахеи. Продукты распада пораженных клеток попадают в кровь, вызывают сильную интоксикацию и повышение температуры тела до 38-39°C. Вирус гриппа оказывает угнетающее действие на кроветворение и иммунную систему. Все это может приводить к вторичным вирусным и бактериальным инфекциям, которые осложняют течение болезни.

**Постинфекционный иммунитет.** Главная роль в формировании приобретенного иммунитета принадлежит вируснейтрализующим антителам,

блокирующим гемагглютинин и нейраминидазу, а также секреторным иммуноглобулинам IgAs. Перенесенное заболевание оставляет за собой антитела, которые сохраняются долгие годы. Связанный с этими антителами иммунитет имеет штаммовую направленность и не гарантирует защиты от заражения новыми вариантами вируса.

**Лабораторная диагностика.** Материалом для исследования служит отделяемое носоглотки, которое получают либо путем смыва, либо с помощью ватно-марлевых тампонов, и кровь. Для диагностики гриппа применяют следующие методы:

1. Вирусологический - заражение куриных эмбрионов, культур клеток почек зеленых мартышек (Vero) и собак (MDCK). Культуры клеток особенно эффективны для выделения вирусов А (H3N2) и В.

2. Серологический - выявление специфических антител и определение возрастания их титра (в парных сыворотках) с помощью РТГА, РСК, иммуноферментного метода.

3. В качестве ускоренной диагностики используют иммунофлуоресцентный метод, позволяющий быстро обнаружить вирусный антиген в мазках-отпечатках со слизистой оболочки носа или в смывах из носоглотки больных.

4. Разработаны методы иммуноферментного анализа для выявления вирусных антигенов непосредственно в материале от больных, а также метод РНК-зонда.

5. Предложена иммуноферментная методика “бескровного” обнаружения специфических секреторных IgAs в слюне в качестве самостоятельного способа диагностики гриппа.

### **Вирус гриппа В.**

Структура вириона сходна со структурой вируса гриппа типа А. Геном состоит из 8 фрагментов, кодирующих 3 неструктурных и 7 структурных белков. По антигенным свойствам гемагглютинина и нейраминидазы различают несколько серовариантов. Процесс антигенного дрейфа выражен слабее, чем у вируса типа А. Вирусы гриппа типа В вызывают локальные вспышки и эпидемии; пандемий не вызывают. Клиника заболевания такая же, как и при гриппе типа А. Лабораторная диагностика такая же, вирус дифференцируется серологически. Специфическая профилактика осуществляется так же, как против гриппа А.

### **Вирус гриппа С.**

Вирион типа С имеет такую же форму, как вирусы типов А и В. Однако он отличается от них не только антигенными свойствами, но и рядом других признаков. Геном представлен однонитевой негативной РНК из 7 фрагментов, нуклеотидная последовательность которых существенно отличается от таковых вирусов типов А и В. Геном кодирует 1-2 неструктурных и 6 структурных белков. У вируса типа С отсутствует нейраминидаза, поэтому на наружной мембране вириона имеется только один тип шипов.

Вирусу типа С не свойственна такая изменчивость, как вирусу типа А. Хотя вирус гриппа С не вызывает пандемий и больших эпидемий, он часто является причиной спорадических заболеваний гриппом. Клиника заболевания такая же, как при относительно умеренных формах гриппа А. Диагностика основана на

выделении вируса в куриных эмбрионах; применяются также иммунофлуоресцентный метод и другие серологические реакции.

**Лечение гриппа** у людей проводится с использованием амантадина, ремантадина, противогриппозного иммуноглобулина, интерферона.

**Специфическая профилактика** заключается в применении вакцин:

- живая из аттенуированного вируса;
- убитая вакцина цельновирионная;
- субвирионная вакцина (из расщепленных вирионов);
- субъединичная вакцина (вакцина, содержащая только гемагглютинин и нейраминидазу).

**После обсуждения** теоретических вопросов преподаватель объясняет порядок проведения самостоятельной работы.

#### **Самостоятельная работа:**

Постановка РТГА с целью типирования выделенного вируса гриппа. В 6 лунок микропанели вносят по 1 капле физиологического раствора. В первую лунку прибавляют 1 каплю диагностической иммунной сыворотки (H1N1, H2N2, H3N2 или В), разведенной 1:5. Готовят 2-кратные разведения сыворотки от 1:10 до 1:320 путем переноса одной капли жидкости из первой лунки во вторую, из второй – в третью и т. д. Из шестой лунки 1 каплю жидкости удаляют. В каждую лунку прибавляют по 1 капле аллантаисной культуры вируса (содержащей 4 ГАЕ/0,025 мл) и по 2 капли 1%-ной взвеси куриных эритроцитов. В седьмую (контрольную) лунку вносят 2 капли физиологического раствора и прибавляют 2 капли 1%-ной взвеси куриных эритроцитов. Панели оставляют на рабочих столах до оседания эритроцитов в контрольной лунке, после чего учитывают результаты.

#### **7. Оценивание знаний, умений, навыков по теме занятия:**

Ответы на вопросы и активность на занятии оцениваются по 5-балльной системе.

#### **8. Литература для подготовки темы:**

##### **8.1. Основная:**

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студентов медицинских вузов. Под ред. А.А. Воробьева. Учебники и учеб. пособия для высшей школы. Издательство: Медицинское информационное агентство, 2012. – 702 с.

2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. Том 1 : учеб. по дисциплине “Микробиология, вирусология и иммунология” для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальностям 060101.65 “Лечеб. дело”, 060103.65 “Педиатрия”, 060104.65 “Медико-профилактич. дело” / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 448 с.: ил.

3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. Том 2 : учеб. по дисциплине “Микробиология, вирусология и иммунология” для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальностям 060101.65 “Лечеб. дело”, 060103.65 “Педиатрия”, 060104.65 “Медико-профилактич. дело” / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 480 с.: ил.

##### **8.2. Дополнительная:**

1. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для студентов мед. вузов / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - 5-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2012. – 759 с.: ил.

2. Медицинская микробиология: учебник. 4-е изд. Поздеев О.К. / Под ред. В.И. Покровского. – 2010. – 768 с.

3. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 / Колл. авторов // Под редакцией Лабинской А.С., Волиной Е.Г. – М.: Издательство БИНОМ, 2008. – 1080 с.: ил.

Методические указания переработаны и дополнены профессором Литусовым Н.В.

Обсуждены на заседании кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии.