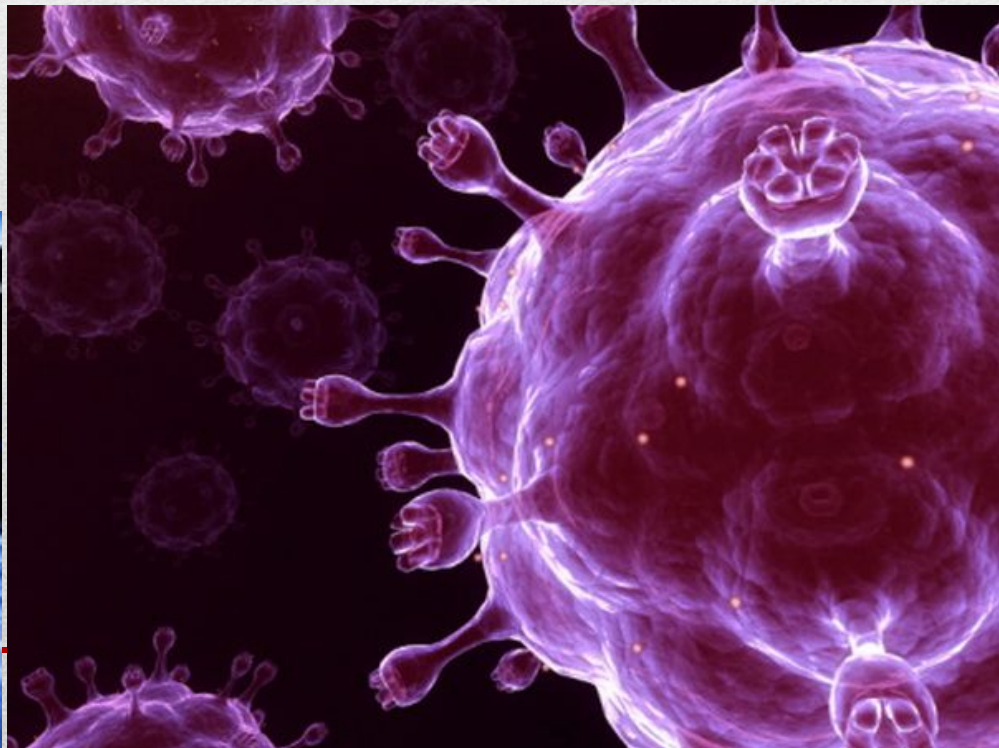
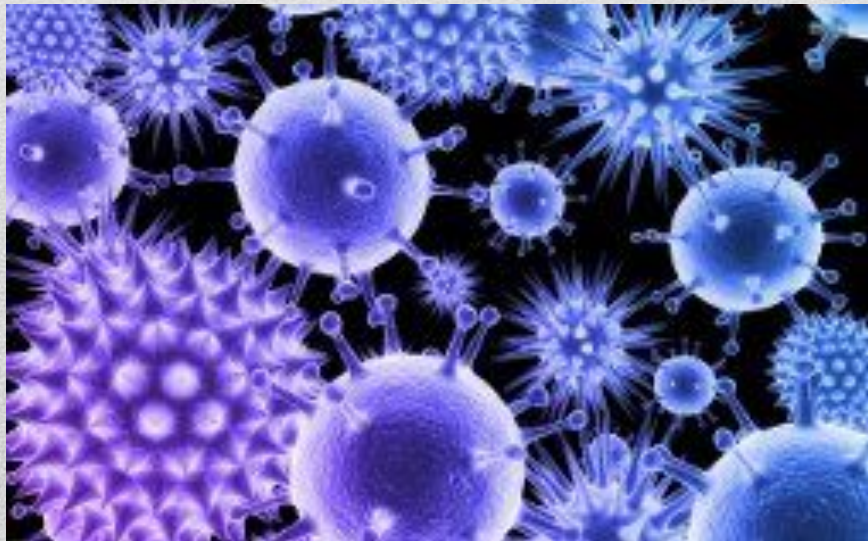
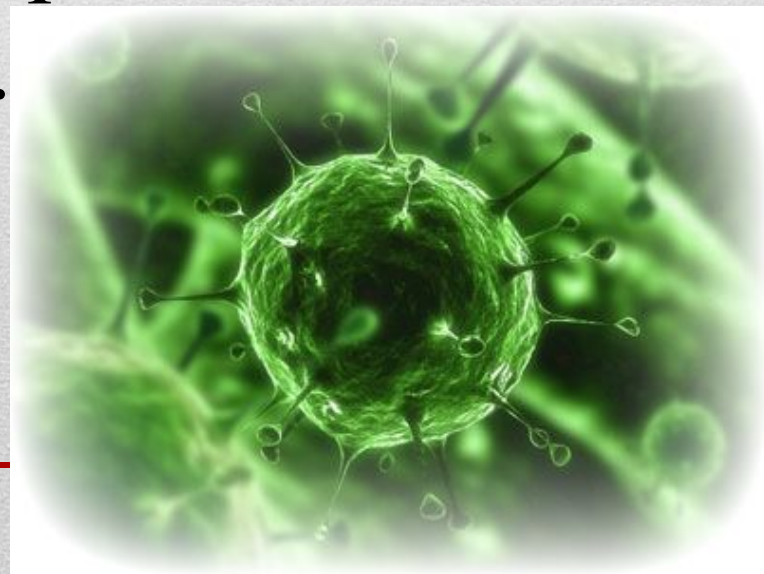


Вирусы-особая форма жизни



Вирусы (лат. «virus» яд) — мельчайшие микроорганизмы, не имеющие клеточного строения, белоксинтезирующей системы и способные к воспроизведению лишь в клетках высокоорганизованных форм жизни (облигатные внутриклеточные паразиты).

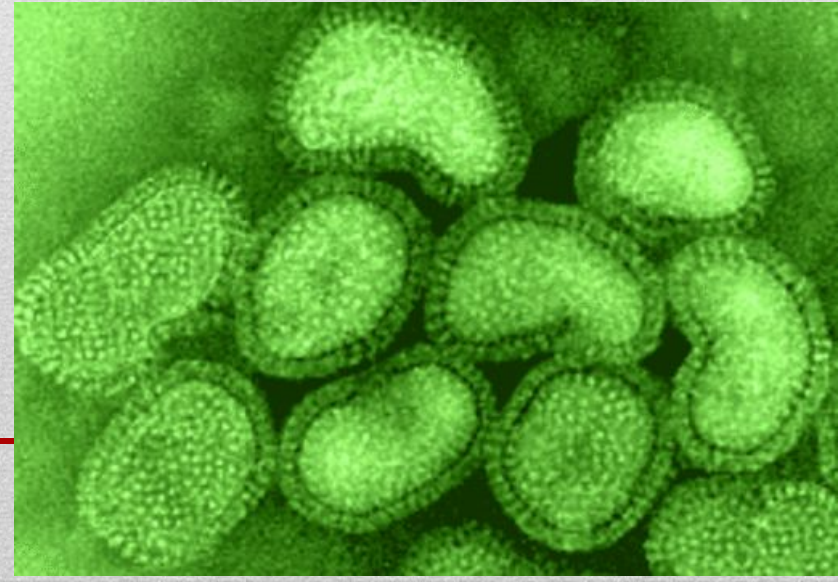
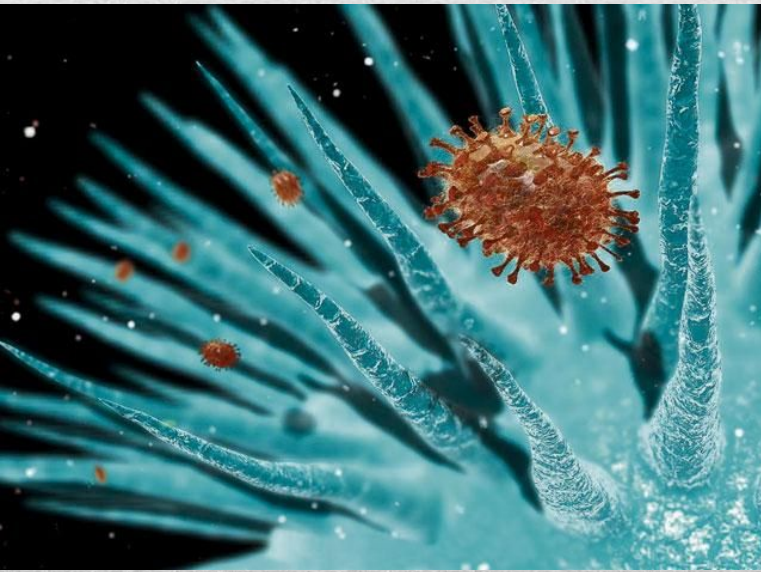


В настоящее время вирусология - бурно развивающаяся наука, что связано с рядом причин:

- ведущей ролью вирусов в инфекционной патологии человека (вирус гриппа, ВИЧ, цитомегаловирус и другие герпесвирусы) на фоне практически полного отсутствия средств специфической химиотерапии;
 - использованием вирусов для решения многих фундаментальных вопросов биологии и генетики.
-

- **Основные свойства вирусов**, по которым они отличаются от остального живого мира.
 - **1. Ультрамикроскопические размеры** (измеряются в нанометрах). Крупные вирусы (вирус оспы) могут достигать размеров 300 нм, мелкие - от 20 до 40 нм. $1\text{мм}=1000\text{мкм}$, $1\text{мкм}=1000\text{нм}$.
 - **2. Вирусы содержат нуклеиновую кислоту только одного типа** - или ДНК (ДНК- вирусы) или РНК (РНК- вирусы). У всех остальных организмов геном представлен ДНК, так и РНК.
 - **3. Вирусы не способны к росту и бинарному делению.**
 - **4. Вирусы размножаются путем воспроизводства себя в инфицированной клетке хозяина за счет собственной геномной нуклеиновой кислоты.**
 - **5. У вирусов нет собственных систем мобилизации энергии и белок- синтезирующих систем, в связи с чем вирусы являются абсолютными внутриклеточными паразитами.**
 - **6. Средой обитания вирусов являются живые клетки - бактерии (это вирусы бактерий/бактериофаги), клетки растений, животных и человека.**

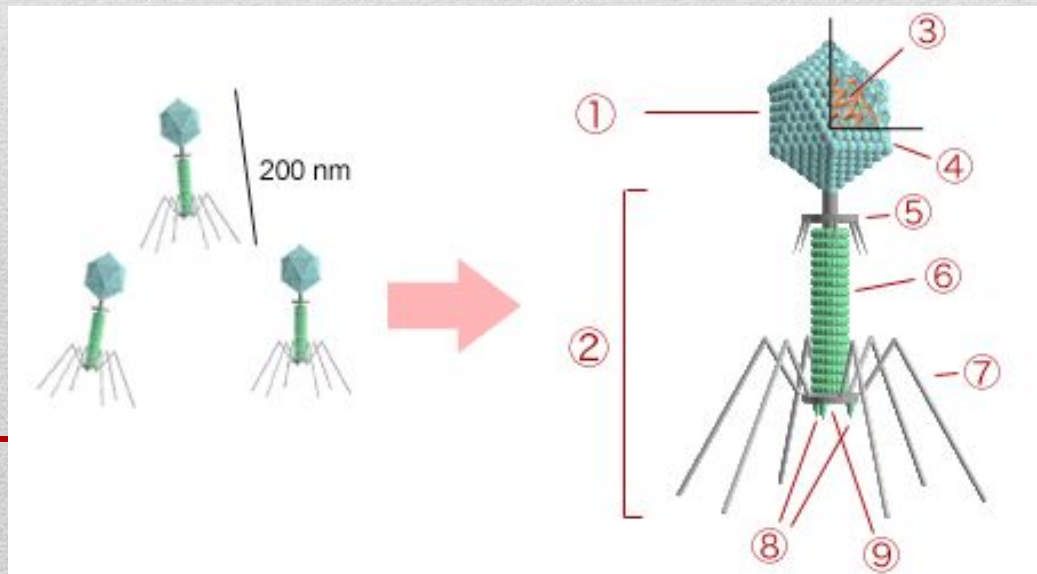
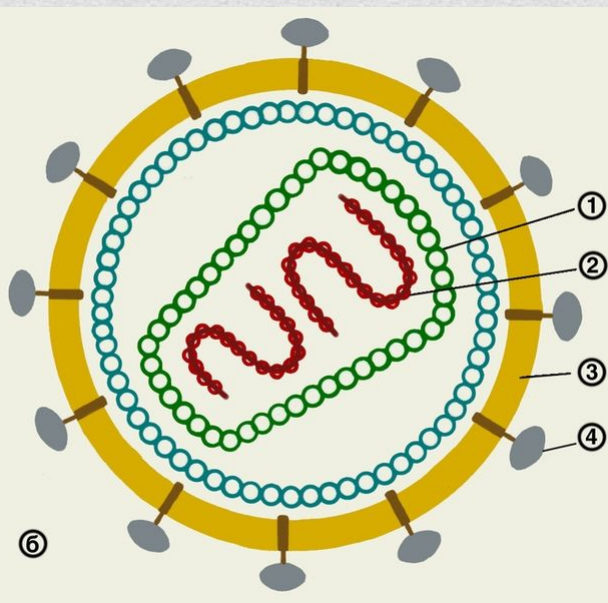
Все вирусы существуют в двух качественно
разных формах:
внеклеточной- **вирион** и внутриклеточной-
вирус. Таксономия этих представителей
микромиира основана на характеристике
вирионов - конечной фазы развития вирусов.



Строение (морфология) вирусов.

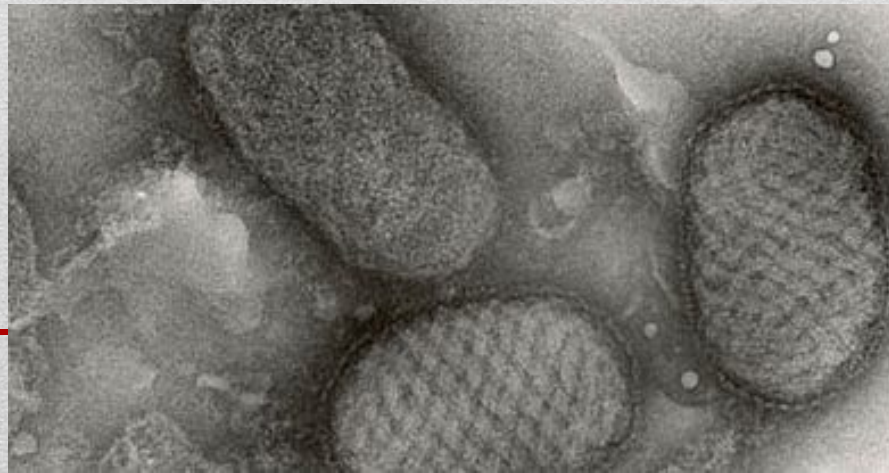
1. *Геном вирусов* образуют нуклеиновые кислоты, представленные одноцепочечными молекулами РНК (у большинства РНК-вирусов) или двухцепочечными молекулами ДНК (у большинства ДНК-вирусов).

2. *Капсид* — белковая оболочка, в которую упакована геномная нуклеиновая кислота. Капсид состоит из идентичных белковых субъединиц- *капсомеров*. Существуют два способа упаковки капсомеров в капсид- спиральный (спиральные вирусы) и кубический (сферические вирусы).



При спиральной симметрии белковые субъединицы располагаются по спирали, а между ними, также по спирали, уложена геномная нуклеиновая кислота.

При кубическом типе симметрии вирионы могут быть в виде многогранников, чаще всего — двадцатигранники — *икосаэдры*.



Симметрия капсида

Спиральная



Смешанная



Кубическая

(икосаздрическая)



Рисунок 1. Морфологические формы вирусов



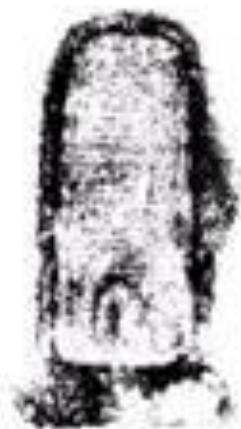
Вирусы иммунодефицита человека



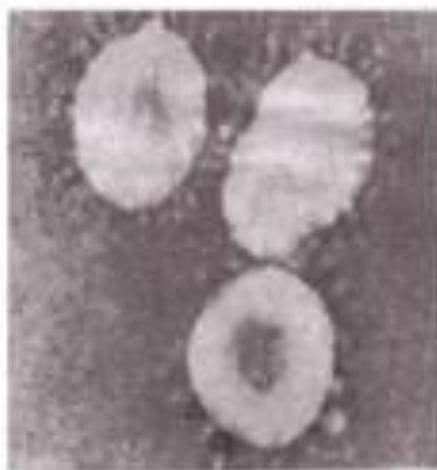
Филовирусы



Бактериофаги



Рабдовирусы



Коронавирусы



Ротавирусы

3. Просто устроенные вирусы имеют только *нуклеокапсид*, т.е. комплекс генома с капсидом и называются “голыми”.

4. У других вирусов поверх капсида есть дополнительная мембраноподобная оболочка, приобретаемая вирусом в момент выхода из клетки хозяина- *суперкапсид*. Такие вирусы называют “одетыми”.

- Основные этапы взаимодействия вируса с клеткой хозяина.
 - 1.Адсорбция– пусковой механизм, связанный со взаимодействием *специфических* рецепторов вируса и хозяина (у вируса гриппа– гемагглютинин, у вируса иммунодефицита человека– гликопротеин gp 120).
 - 2.Проникновение– путем слияния суперкапсида с мембраной клетки или путем эндоцитоза (пиноцитоза).
 - 3.Освобождение нуклеиновых кислот– “раздевание” нуклеокапсида и активация нуклеиновой кислоты.
 - 4.Синтез нуклеиновых кислот и вирусных белков, т.е. подчинение систем клетки хозяина и их работа на воспроизводство вируса.
 - 5.Сборка вирионов– ассоциация реплицированных копий вирусной нуклеиновой кислоты с капсидным белком.
 - 6.Выход вирусных частиц из клетки, приобретения суперкапсида оболочечными вирусами.
-

- Исходы взаимодействия вирусов с клеткой хозяина.

1. *Абортивный процесс* – когда клетки освобождаются от вируса:

- при инфицировании *дефектным* вирусом, для репликации которого нужен вирус – помощник, самостоятельная репликация этих вирусов невозможна (так называемые *вирусоиды*). Например, вирус дельта (D) гепатита может реплицироваться только при наличии вируса гепатита В, его Hbs — антигена, аденоассоциированный вирус – в присутствии аденовируса);
 - при инфицировании вирусом генетически нечувствительных к нему клеток;
 - при заражении чувствительных клеток вирусом в неразрешающих условиях.
-

• **2. Продуктивный процесс- репликация (продукция) вирусов:**

- *гибель (лизис) клеток (цитопатический эффект)- результат интенсивного размножения и формирования большого количества вирусных частиц — характерный результат продуктивного процесса, вызванного вирусами с высокой цитопатогенностью (носит достаточно узнаваемый специфический характер);*
 - *стабильное взаимодействие, не приводящее к гибели клетки (персистирующие , хронические, медленные, латентные инфекции) — вирусная трансформация клетки.*
-

- **3. Интегративный процесс**- интеграция вирусного генома с геномом клетки хозяина.
- вариант продуктивного процесса по типу стабильного взаимодействия
- Вирус реплицируется вместе с геномом клетки хозяина и может длительно находиться в латентном состоянии. Встраиваться в ДНК- геном хозяина могут только ДНК- вирусы (принцип “ДНК- в ДНК”). Единственные РНК- вирусы, способные интегрироваться в геном клетки хозяина- **ретровирусы**, имеют для этого специальный механизм (синтез ДНК провируса на основе геномной РНК с помощью фермента обратной транскриптазы с последующим встраиванием ДНК в геном хозяина).

- **Острая инфекция** - после образования вирусного потомства клетка погибает/выздоровливает и не содержит вирусных частиц.
 - **Хроническая** - клетка продолжает длительно продуцировать вирусные частицы и передавать эту способность дочерним клеткам.
-

Пути проникновения вируса в организм:

- **Воздушно-капельный:**

1. респираторные вирусы репродуцируются в эпителии ВДП, местная инфекция

2. ВДП-входные ворота, без местных проявлений-генерализация (ветряная оспа, корь, паротит)

Пищевой: энтеровирусы, реовирусы

Трансмиссивно: арбовирусы

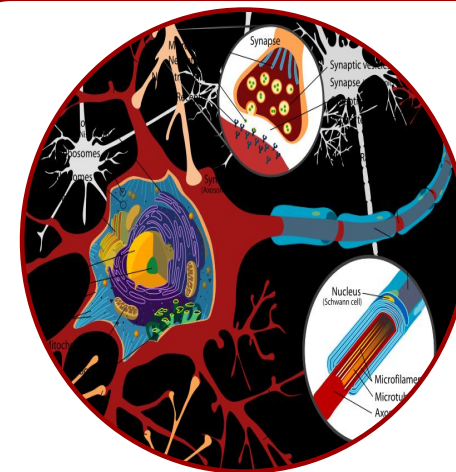
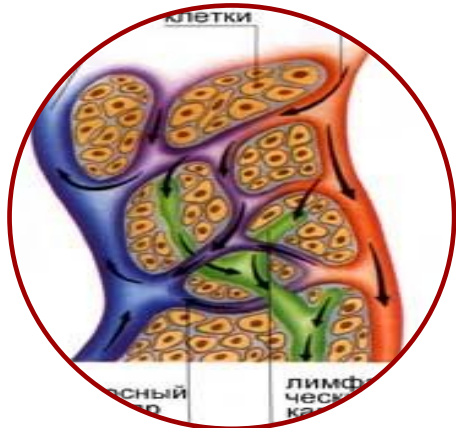
Транскутанно: бешенство, папиллома

Половой: герпес-вирусы

Парентеральный: гепатиты

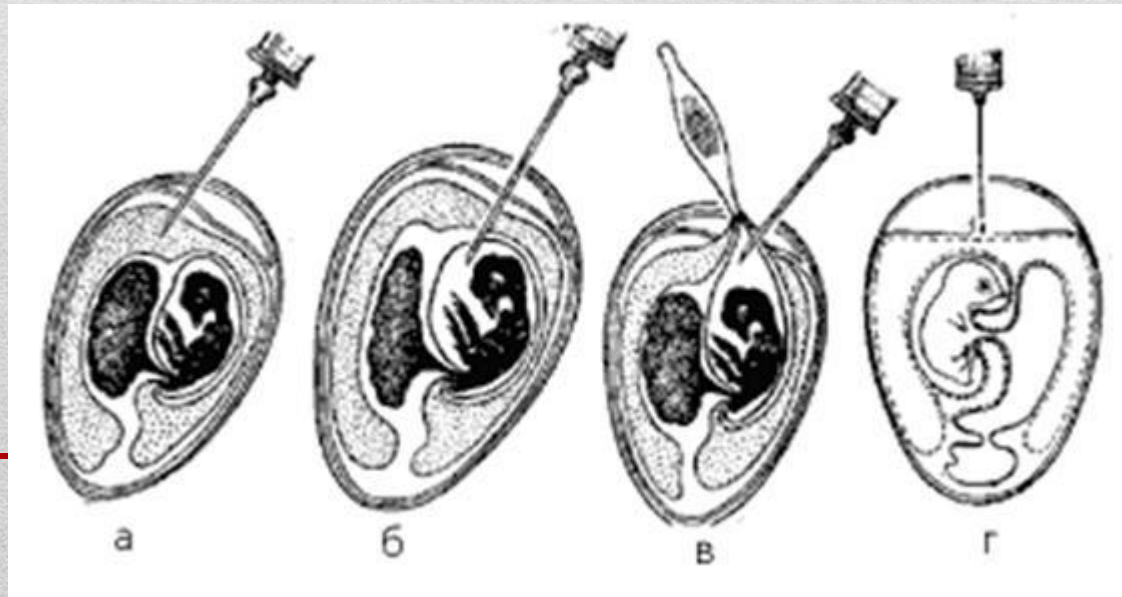
Вертикальный: герпес, краснуха

• Распространение вирусов



Основные методы культивирования вирусов.

1. В организме лабораторных животных.
2. В куриных эмбрионах.
3. В клеточных культурах — основной метод.



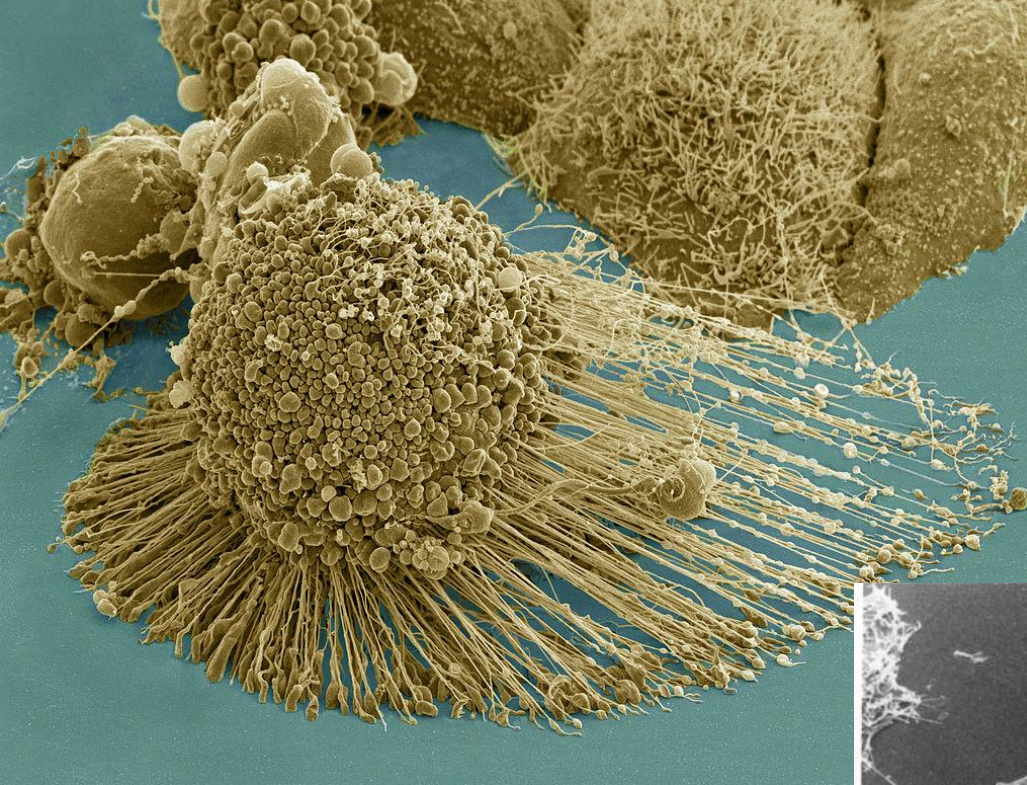
Типы клеточных культур.

1. *Первичные (трипсинизированные) культуры*- фибробласты эмбриона курицы (ФЭК), человека (ФЭЧ), клетки почки различных животных и т.д. Первичные культуры получают из клеток различных тканей чаще путем их размельчения и трипсинизации, используют однократно, т.е. постоянно необходимо иметь соответствующие органы или ткани.

2. *Линии диплоидных клеток* пригодны к повторному диспергированию и росту, как правило не более 20 пассажей (теряют исходные свойства).

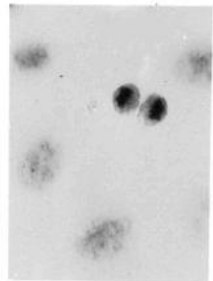
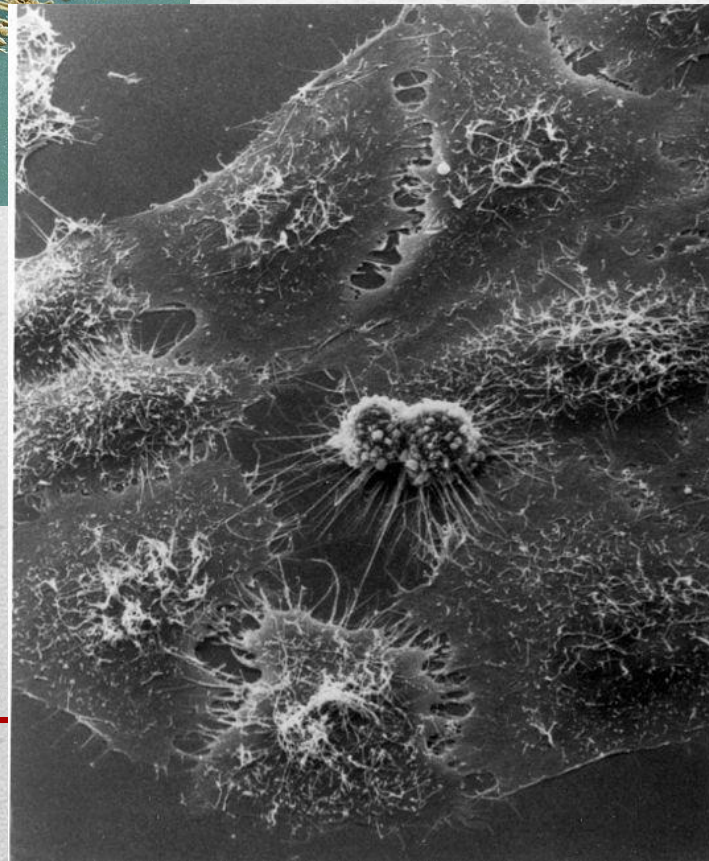
3. *Перевиваемые линии* (гетероплоидные культуры), способны к многократному диспергированию и перевиванию, т.е. к многократным пассажам, наиболее удобны в вирусологической работе- например, линии опухолевых клеток Hela, Нер и др.

- **HeLa** — линия «бессмертных» клеток, используемая во множестве научных исследований в области биологии и фармакологии
 - Линия была получена 8 февраля 1951 года из раковой опухоли шейки матки пациентки по имени Генриетта Лакс (англ. *Henrietta Lacks*), умершей от этого заболевания 4 октября того же года.
 - Клетки из опухолевого образования Генриетты были изъяты без её ведома и согласия исследователем Джорджем Гейем, который обнаружил, что в них можно поддерживать жизнь. Ему удалось выделить одну конкретную клетку, умножить её и начать клеточную линию. Он назвал их клетками HeLa, по начальным буквам имени Генриетты Лакс. Это первые клетки, выращенные в лаборатории, которые были «бессмертными» — они не погибали после нескольких делений и могли быть использованы во многих экспериментах.
 - Особенности
 - Клетки HeLa называют «бессмертными», они способны делиться бесконечное число раз, в отличие от обычных клеток, имеющих предел Хейфлика. Это происходит потому, что как и при многих типах раковых опухолей, клетки HeLa производят фермент теломеразу, которая наращивает теломеры на концах ДНК хромосом. Существующая по сей день популяция клеток HeLa унаследована от образцов ткани, извлечённой у Генриетты Лакс. Эти клетки пролиферируют необычайно быстро, даже в сравнении с другими раковыми клетками. Иногда эти клетки заражают культуры других клеток.
 - Клетки HeLa были с самого начала заражены вирусом папилломы, что часто случается с клетками рака, от которого умерла Генриетта. Клетки HeLa обладают аномальным кариотипом, различные сублинии HeLa имеют 49 — 78 хромосом, в отличие от нормального кариотипа человека, содержащего 46 хромосом^[3].
 - Клетки HeLa эволюционировали за эти годы, адаптируясь к росту in vitro, и по причине их разделения возникло несколько ветвей. На данный момент существует несколько линий клеток HeLa, все они происходят от общего предка, эти линии клеток используют, в том числе в качестве модели раковых клеток, для исследования механизмов передачи сигнала между клетками и для других применений.
-



- Клетки HeLa под электронным микроскопом

Деление клеток HeLa
под
электронным
микроскопом



- Специальные питательные среды для культур клеток.
 - синтетические вирусологические питательные среды сложного состава с факторами роста- среда 199, Игла, раствор Хэнкса, гидролизат лактальбумина. В среды добавляют стабилизаторы рН (Hepes), различные в видовом отношении сыворотки крови (наиболее эффективной считают эмбриональную телячью сыворотку), L-цистеин и L-глутамин.
 - В зависимости от функционального использования среды могут быть *ростовые* (с большим содержанием сыворотки крови) — их используют для выращивания клеточных культур до внесения вирусных проб, и *поддерживающие* (с меньшим содержанием сыворотки или ее отсутствием)- для содержания инфицированных вирусом клеточных культур.
-

Выявляемые проявления вирусной инфекции клеточных культур.

МЕТОДЫ ИНДИКАЦИИ ВИРУСОВ

- 1. Цитопатический эффект.
- Цитопатические эффекты вирусов оценивают при микроскопии клеточных культур (вирусы с высокой или умеренной цитопатогенностью). Размножение вирусов в культурах клеток сопровождается нарушениями морфологии клеток монослоя. Некоторые вирусы вызывают характерные цитопатические изменения, что (с учётом клинической картины заболевания) позволяет быстро поставить предварительный диагноз. Например, размножение парамиксовирусов (вирусы кори, паротита, РС-вирус) сопровождается появлением характерных гигантских многоядерных клеток; аденовирусы вызывают образование скоплений больших круглых клеток, а при репродукции герпесвирусов клетки округлой формы диффузно располагаются по всему монослою.

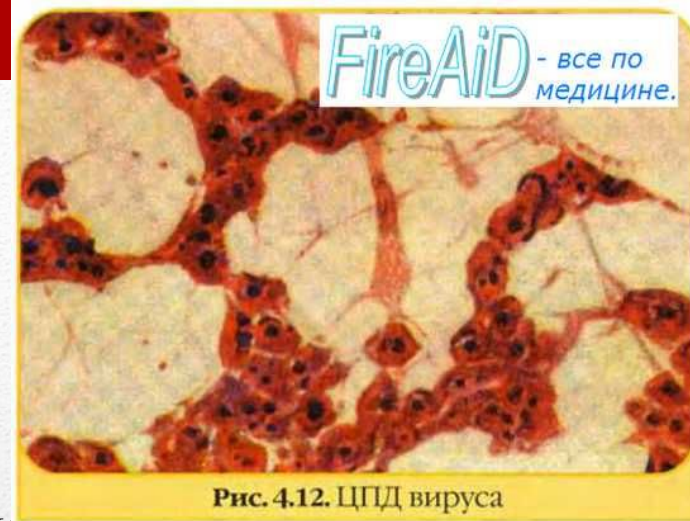


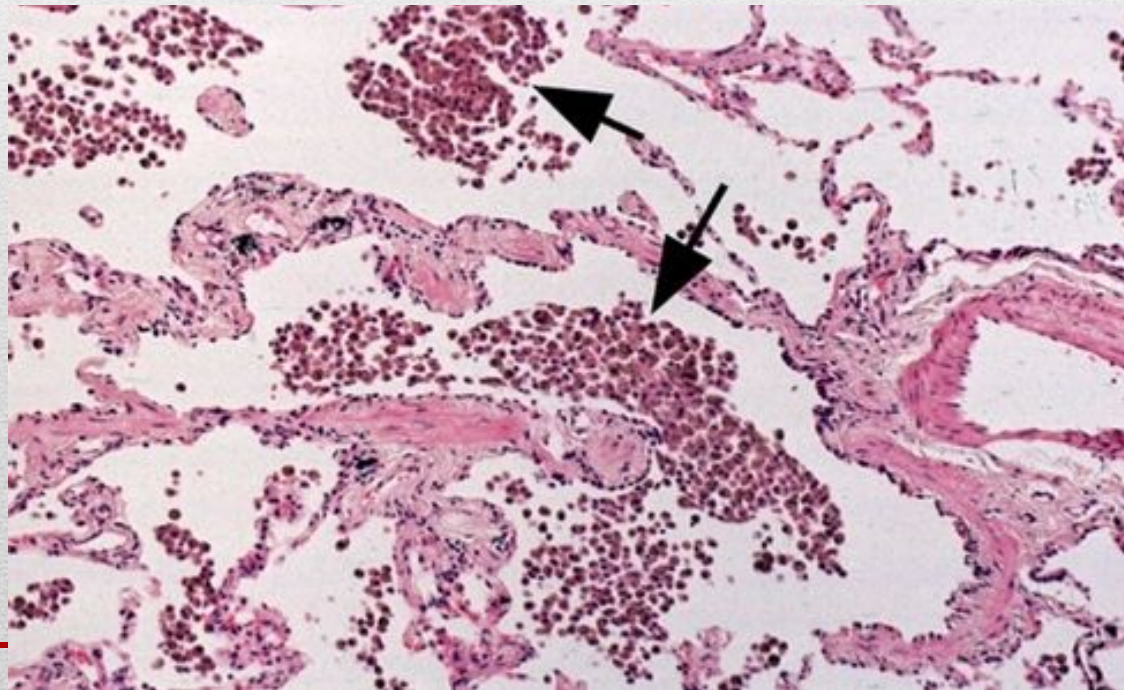
Рис. 4.12. ЦПД вируса

2. Тельца включений.

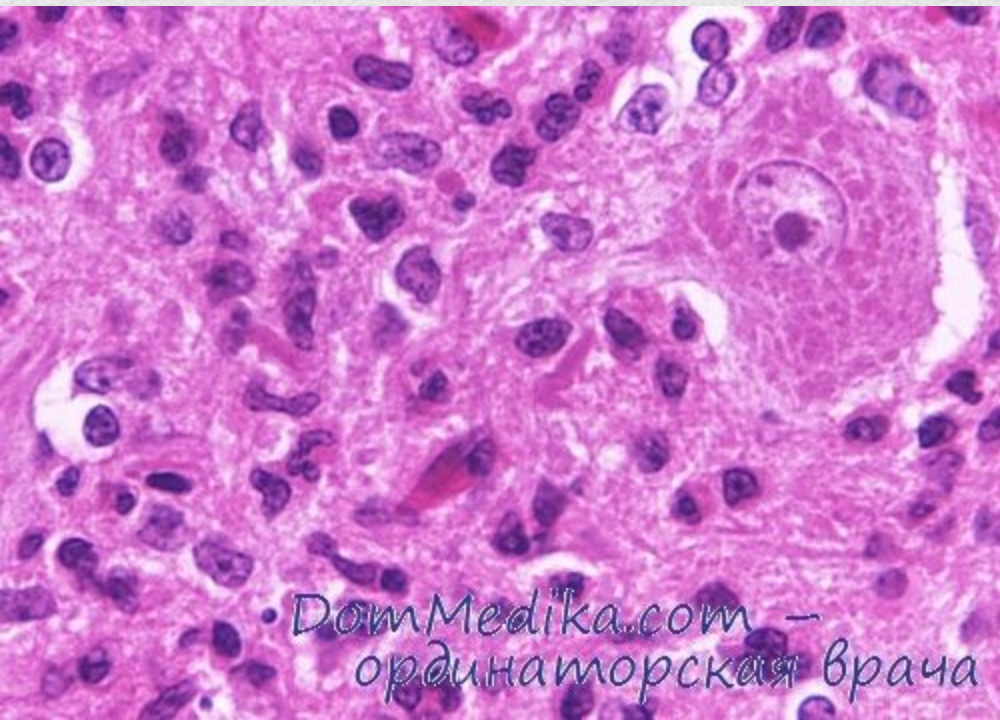
Многие вирусы вызывают появление в заражённых клетках характерных образований — скоплений вирусных белков или частиц, видимых в световой микроскоп. Тельца включений могут располагаться как в цитоплазме (тельца Гварнери при оспе), так и в ядрах клеток (аденовирусы).

- ТЕЛЬЦА ПАШЕНА

- вирусные частицы, обнаруживаемые в ороговевших клетках эпидермиса у больных, страдающих коровьей или натуральной оспой.



- Обнаружение телец Бабеша-Негри в мазках-отпечатках, гистологических срезах мозга и ткани слюнных желез также быстрым методом диагностики бешенства.
- В одной клетке может быть одно или несколько телец. Они окружены четко очерченной оболочкой и имеют внутреннюю структуру в виде базофильной зернистости, чаще располагаются около ядра.



3. Бляшкообразование вирусов

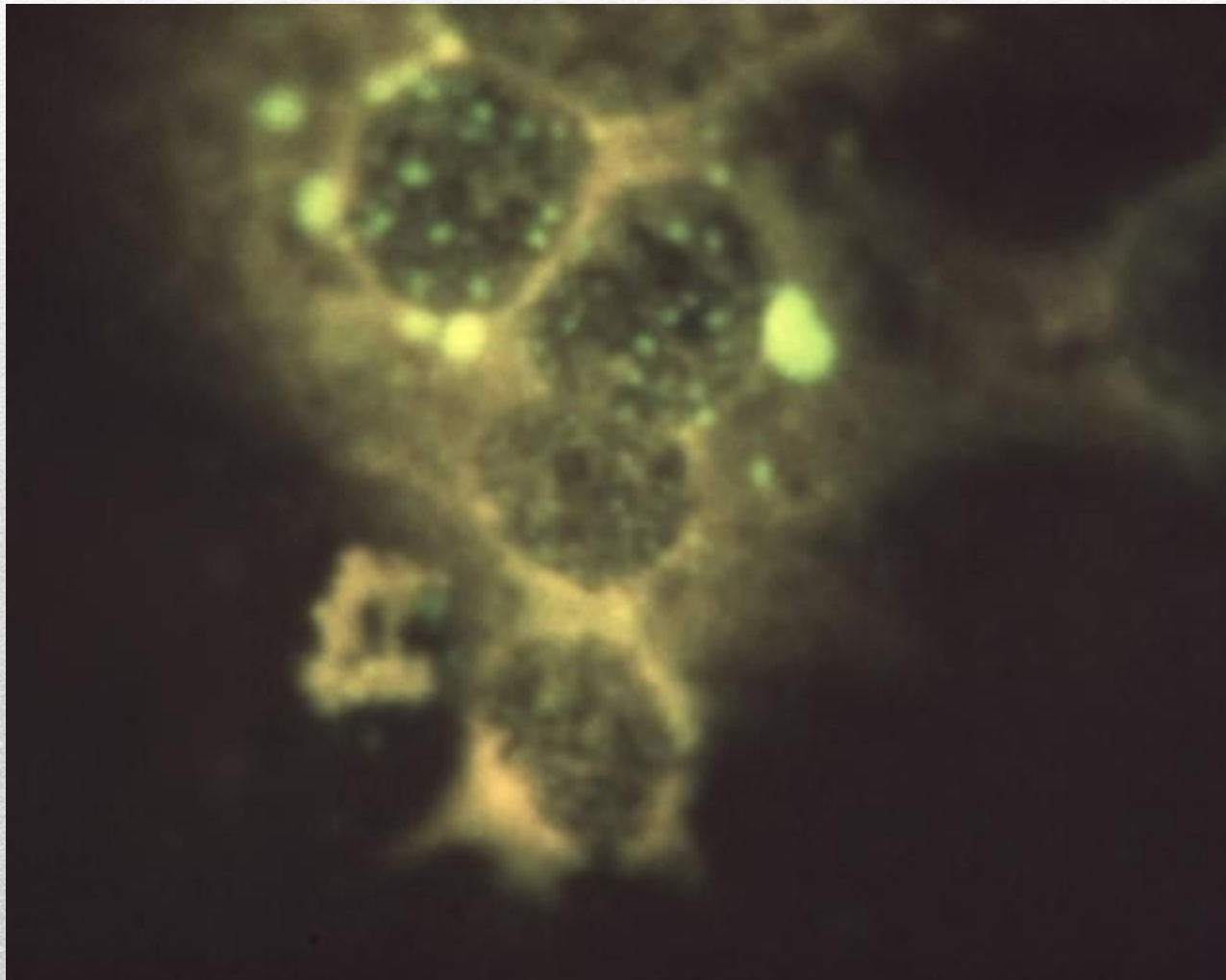
- «Бляшками» называют негативные колонии — участки разрушенных клеток, выглядящие как зоны просветления на монослоях клеток, покрытых слоем агара. В некоторых случаях дозу и цитопатогенность вируса выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ).



Рис. 4.14. «Бляшки» (негативные колонии вируса)

«Бляшки», или «негативные» колонии — ограниченные участки разрушенных вирусами клеток, культивируемых на питательной среде под агаровым покрытием, видимые как светлые пятна на фоне окрашенных живых клеток. Один вирион образует потомство в виде одной «бляшки». «Негативные» колонии разных вирусов отличаются по размеру, форме, поэтому метод «бляшек» используют для дифференциации вирусов, а также для определения их концентрации.

4. Выявление вирусов методом флюоресцирующих антител (МФА), электронной микроскопией, автордиографией.



Люминесцентная микрофотография культуры клеток амниона человека, зараженных вирусом кори: зоны локализации вирусного антигена обладают зеленоватым свечением

5. Цветная проба СОЛКА

Обычный цвет используемых культуральных сред (среда Игла, 199), содержащих в качестве индикатора рН феноловый красный, при оптимальных для клеток условиях культивирования (рН около 7,2) – красный.

Размножение клеток, не зараженных вирусом, меняет рН и соответственно – цвет среды с красного **на желтый** за счет смещения рН в кислую сторону.

При размножении в клеточных культурах вирусов происходит лизис клеток, изменения рН и цвета среды не происходит.

6. Выявление гемагглютинаина вирусов – гемадсорбция, гемагглютинация.

- Гемадсорбцией называется адсорбция (прилипание) эритроцитов к поверхности клеток, зараженных вирусом. Чаще это явление наблюдают у гемагглютинирующих вирусов.
- Чтобы наблюдать гемадсорбцию, из пробирки с зараженной вирусом культурой клеток удаляют культуральную жидкость и вносят 0,5%-ную взвесь эритроцитов, оставляют на 5—10 мин, затем слой клеток споласкивают физиологическим раствором (чтобы смыть эритроциты).
- Если в зараженной культуре клеток идет репродукция вируса, то на таких клетках под малым увеличением микроскопа можно видеть адсорбировавшие эритроциты, в контрольных (незараженных) культурах ~~клеток таковые отсутствуют.~~

Методы
лабораторной
диагностики
вирусов

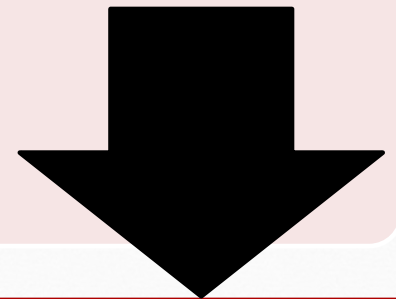
вирусоскопический

серологический

вирусологический

Включения,
цитопатическое
действие

Серодиагностика:
РН, РСК, РНИФ,
ИФА и др.



1 этап: накопление вируса

(культивирование на лаб.животных, в куриных эмбрионах, культуре ткани)

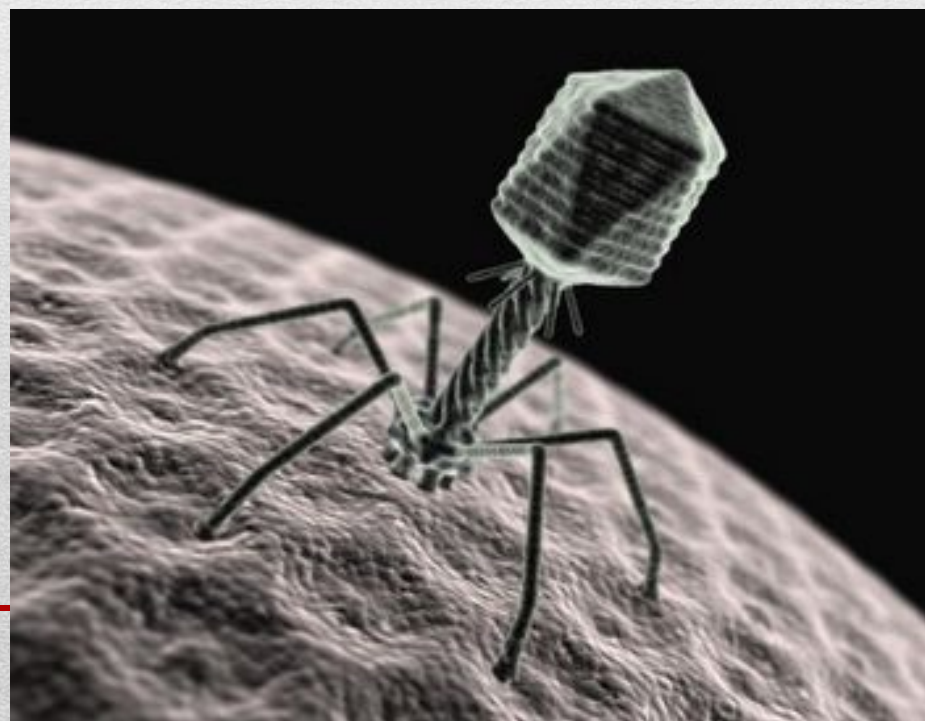
2 этап: индикация вируса

(включения, бляшки)

3 этап: сероидентификация – РН,
РТГА, РИФ, ИФА, ПЦР

- Номенклатура вирусов.
 - Название семейства вирусов заканчивается на “*viridae*”, рода – “*virus*”, для вида обычно используют специальные названия, например — вирус краснухи, вирус иммунодефицита человека – ВИЧ, вирус парагриппа человека типа 1 и т.д.
-

**Понятие: бактериофаг.
Как используется в практической
медицине?**



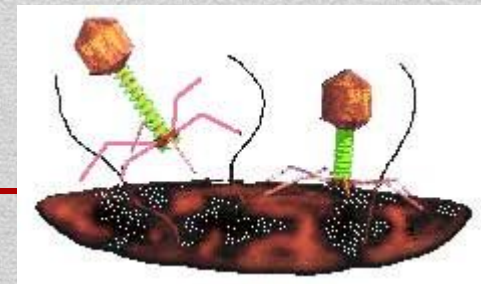
Бактериофаги

Бактериофагами (фагами) называются вирусы, поражающие прокариотическую клетку.

- Бактериофаги были открыты вскоре после эпохального открытия Ивановского; однако их структура и особенности взаимодействия с бактериальной клеткой прояснились лишь на переломе XX века.
 - Бактериофаги **открыл** д'Эрелль в 1917 году.
-

Номенклатура фагов основана на видовом наименовании хозяина. Это значит, что название конкретного бактериофага – это название того вида бактериального вида, которые является основным хозяином данного фага, с добавлением буквенного, или числового, или буквенно-числового обозначения (например: *Escherichia coli* λ , *Escherichia coli* T2 и т.п.).

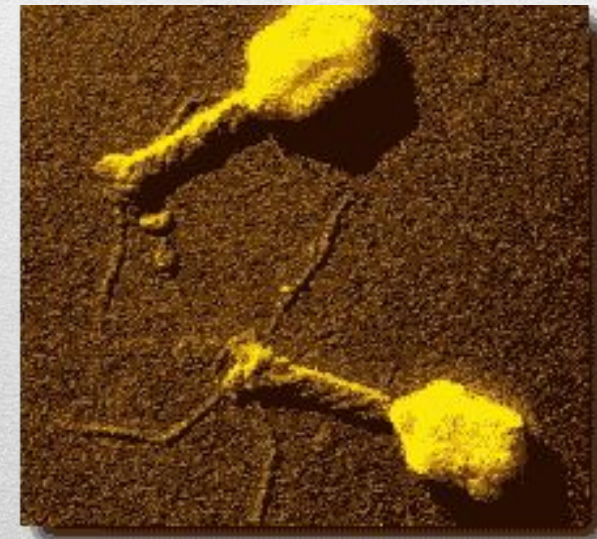
Структура бактериофага может быть в принципе описана как нуклеиновая кислота, окруженная белковой оболочкой. Как и у всех вирусов, в составе бактериофага может быть только один тип нуклеиновой кислоты – или ДНК или РНК.



- НК бактериофага содержится в его **головке** – икосаэдральной структуре, формирующей вокруг нуклеиновой кислоты белковую оболочку.
- может иметь **отросток** – трубчатую белковую структуру, через которую НК внедряется в клетку, к которой прикрепился бактериофаг.
- 3. БФ могут иметь **дополнительные структуры** – например, базальную пластинку, концевые нити и т.д



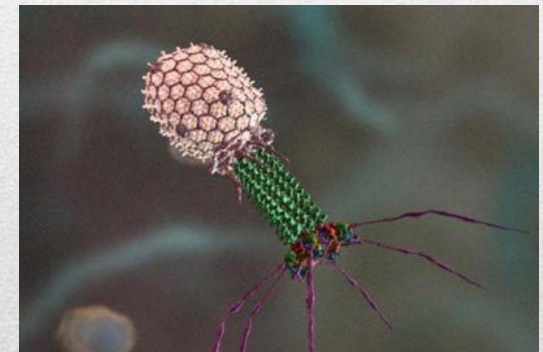
Бактериофаг T2
(схема строения)



Бактериофаг T2 (электронная микроскопия – объемная фотография)

Классификация бактериофагов по спектру действия

- БФ, поражающие несколько видов бактерий - **полифаги**.
- **монофаги** – поражают особей только одного вида (= **видовые**).
- **типовые** – они поражают не всех особей данного вида, а только часть их. Именно в зависимости от чувствительности к таким бактериофагам выделяют внутри одного вида различные **фаговары** (или, в более старом варианте термина, фаготипы).



Прикрепление фага

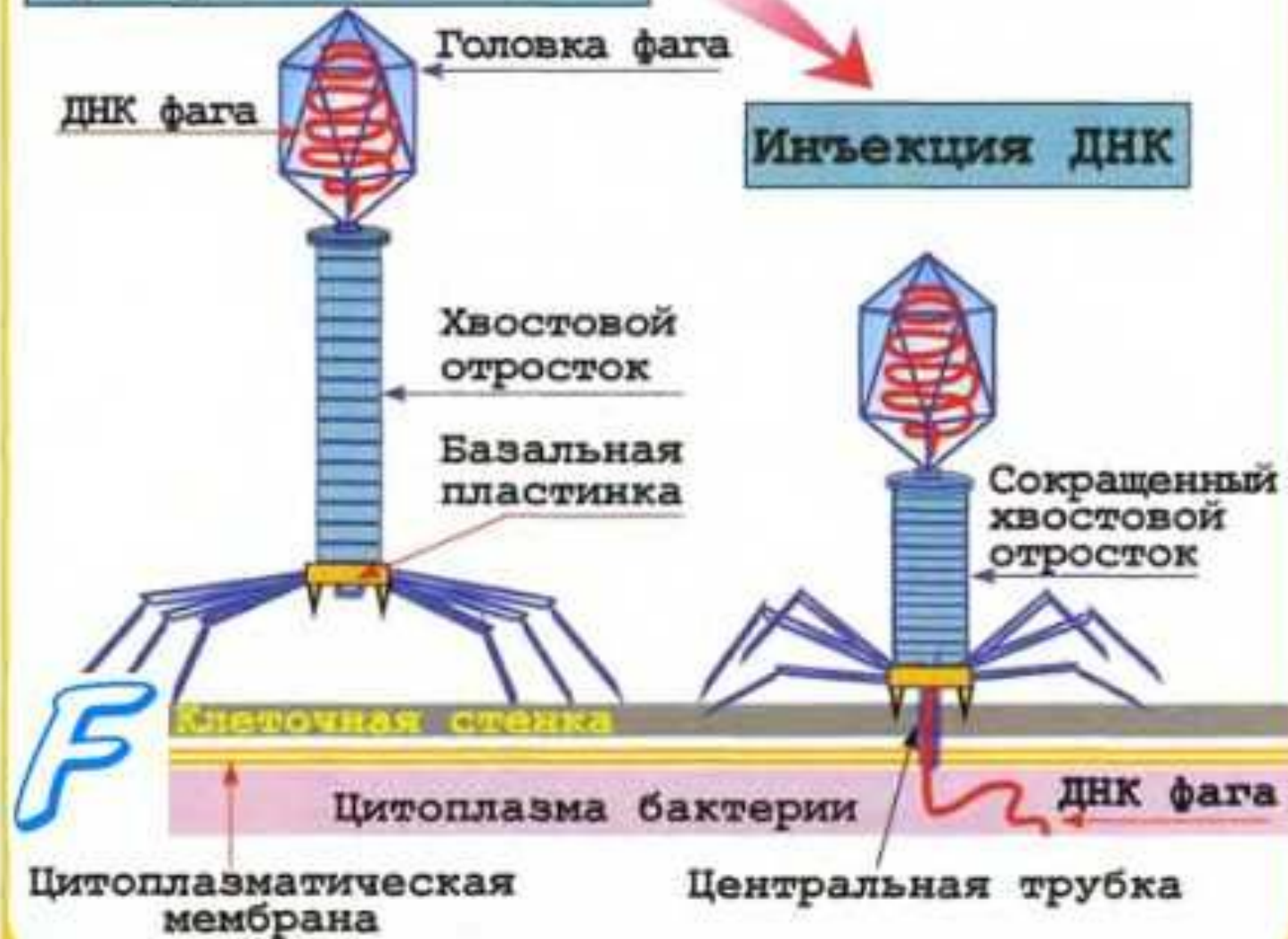


Рис. 4.17. Взаимодействие бактериофага с оболочкой бактерии

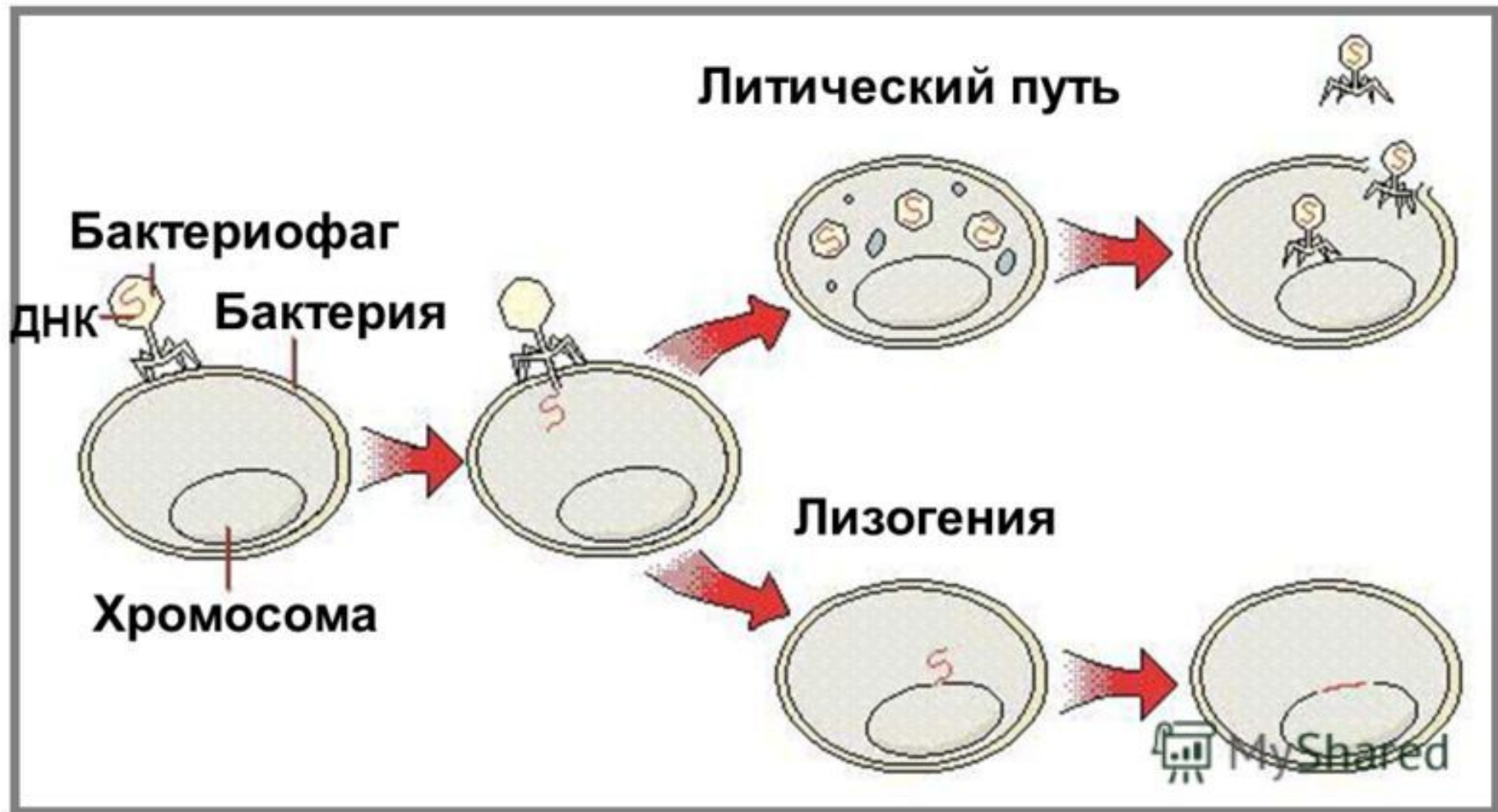
Взаимодействие бактериофага с бактериальной клеткой

- БФ адсорбируется на специальных, специфических для конкретного фага, рецепторах клеточной стенки **чувствительной** бактериальной клетки.
 - Следующая стадия – **проникновение нуклеиновой кислоты** БФ внутрь бактериальной клетки (*депротеинизация*).
 - В дальнейшем происходит **взаимодействие БФ с геномом** пораженной клетки.
-

Взаимодействие бактериофага с бактериальной клеткой

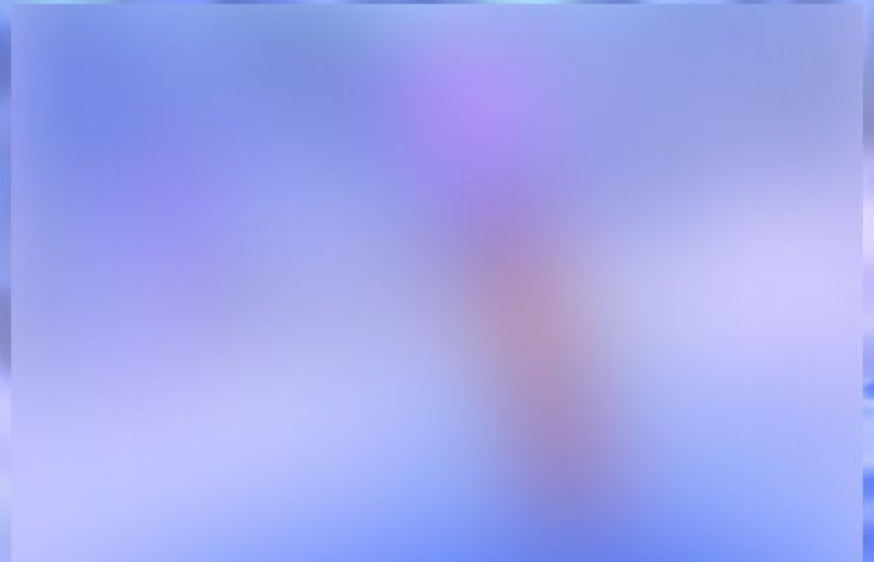
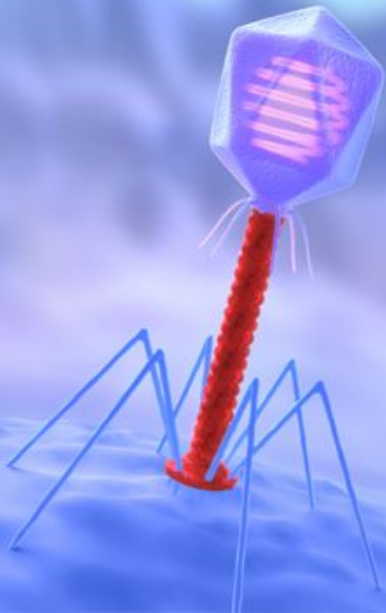
- Синтез ДНК и белка

- Формирование



Практическое применение фагов

- Бактериофаг в медицинской практике применяется в диагностике, лечении и профилактике инфекционных заболеваний.



- В диагностике бактериофаг применяется при осуществлении культурального метода исследования для определения вида выделенной чистой культуры, также для ее типирования.



Фаготерапия.

- Применение бактериофагов (как правило, видовых) для лечения.
- применяются местно (в виде орошения пораженной поверхности, вкалывая в локальный очаг патологического процесса и т.п.), так как введение их парентеральным путем приводит к развитию иммунного ответа на чужеродный фаговый белок. Если лечебный бактериофаг применяют перорально (для лечения кишечных инфекций), то лучше всего использовать таблетированную форму препарата, покрытую кислотоустойчивой оболочкой, растворяющейся в щелочной среде кишечника – БФ очень чувствительный к низкому рН и быстро инактивируется в кислой среде желудка.



- **Фагопрофилактика** – использование БФ (тоже, как правило, видового) для профилактики развития бактериальной инфекции.
- Для экстренной профилактики брюшного тифа и дизентерии (под экстренной профилактикой понимается комплекс мероприятий для предотвращения развития болезни уже после совершившегося акта инфицирования, т.е. попадания возбудителя в организм пациента).

