

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

МОРФОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ ВИРУСОВ.

Лектор ст.преп. Малярчук А.Р.





Д.И. ИВАНОВСКИЙ

Термин “вирус” означает “яд”.



Термин “вирус” означает “яд”.

Вирусы - это неклеточные системы живых существ, которые отличаются своими малыми размерами, отсутствием в вирионе белоксинтезирующих и энергогенерирующих систем, а также облигатным внутриклеточным паразитизмом.

**Целая вирусная частица называется
вирионом**



Главное свойство вируса - предоставить свой геном в клетке-хозяине, для того, чтобы состоялась его экспрессия (трансляция и транскрипция)



За своей степенью опасности для людини вирусы разделяют на четыре группы.

I группа: возбудители лихорадки Эбола, Ласса, Марбурга, Мачупо, натуральной оспы, а также вирус гепатита В (мартышек).

II группа - арбовирусы, некоторые аренавирусы, вирусы бешенства, вирусы гепатита С и В человека, ВИЧ.

III группа - вирусы гриппа, полиомиелита, энцефаломиокардита, осповакцины.

IV группа - аденовирусы, коронавирусы, герпесвирусы, реовирусы, онковирусы.



Принципы классификации вирусов

- (1) Тип нуклеиновой кислоты, ее структура, стратегия репликации
- (2) Размеры, морфология, симметрия вириона, число капсомеров, наличие суперкапсида.
- (3) Наличие специфических ферментов, особенно РНК- и ДНК-ПОЛИМЕРАЗ, нейраминидазы
- (4) Чувствительность к физическим и химическим агентам, особенно к эфиру
- (5) Иммунологические свойства
- (6) Естественные механизмы передачи
- (7) Тропизм к хозяину, его тканям и клеткам
- (8) Патология, формирования включений
- (9) Симптоматология заболеваний.



Классификация вирусов

ДНК-содержащие вирусы

Hepadnaviridae

Parvoviridae

Papovaviridae

Adenoviridae

Herpesviridae

Poxviridae

Iridoviridae



Класификация вирусов

РНК-содержащие вирусы

Picornaviridae

Caliciviridae

Togaviruses

Flaviviridae

Coronaviridae

Rhabdoviridae

Filoviridae

Paramyxoviruses

Orthomyxoviruses

Bunyaviridae

Arenaviridae

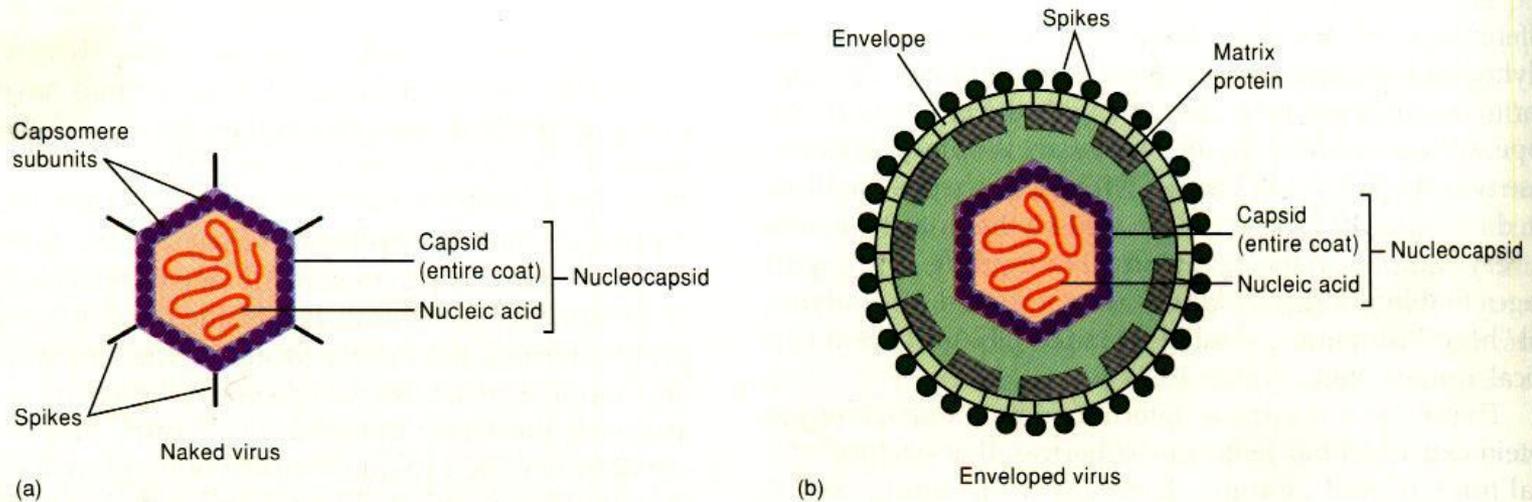
Reoviridae

Birnaviridae

Retroviridae



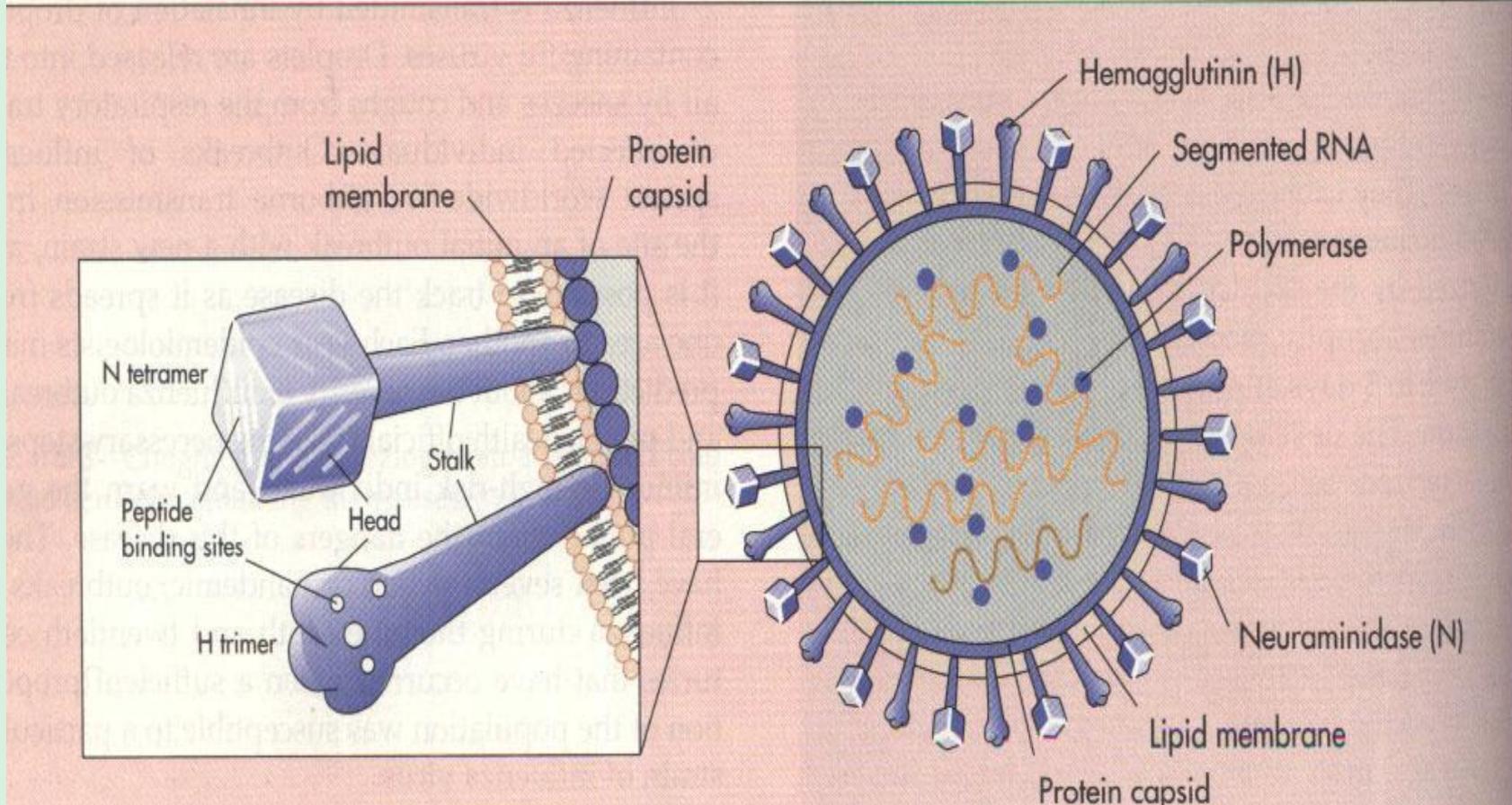
Структура вирусов



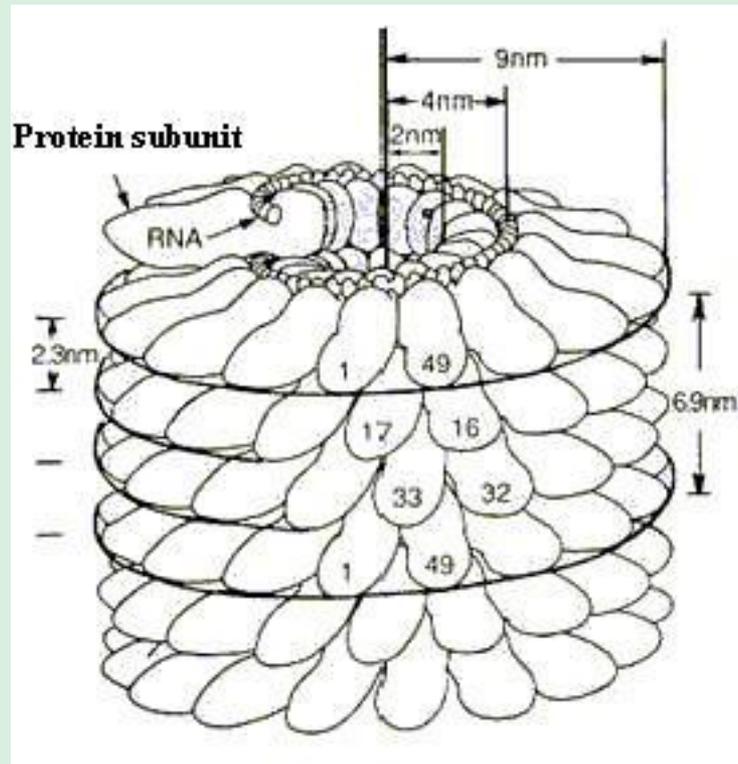
A – простой вирус

B – сложный вирус

Строение вирусов

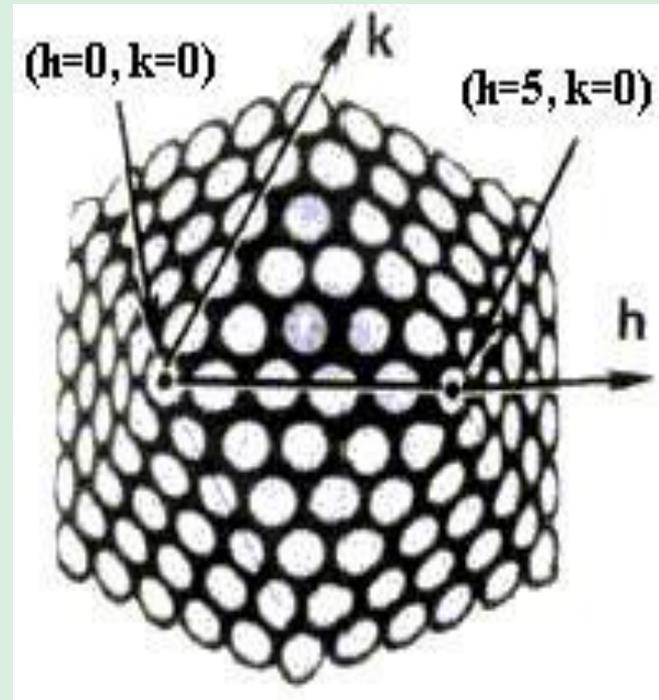


Спиральный тип симметрии

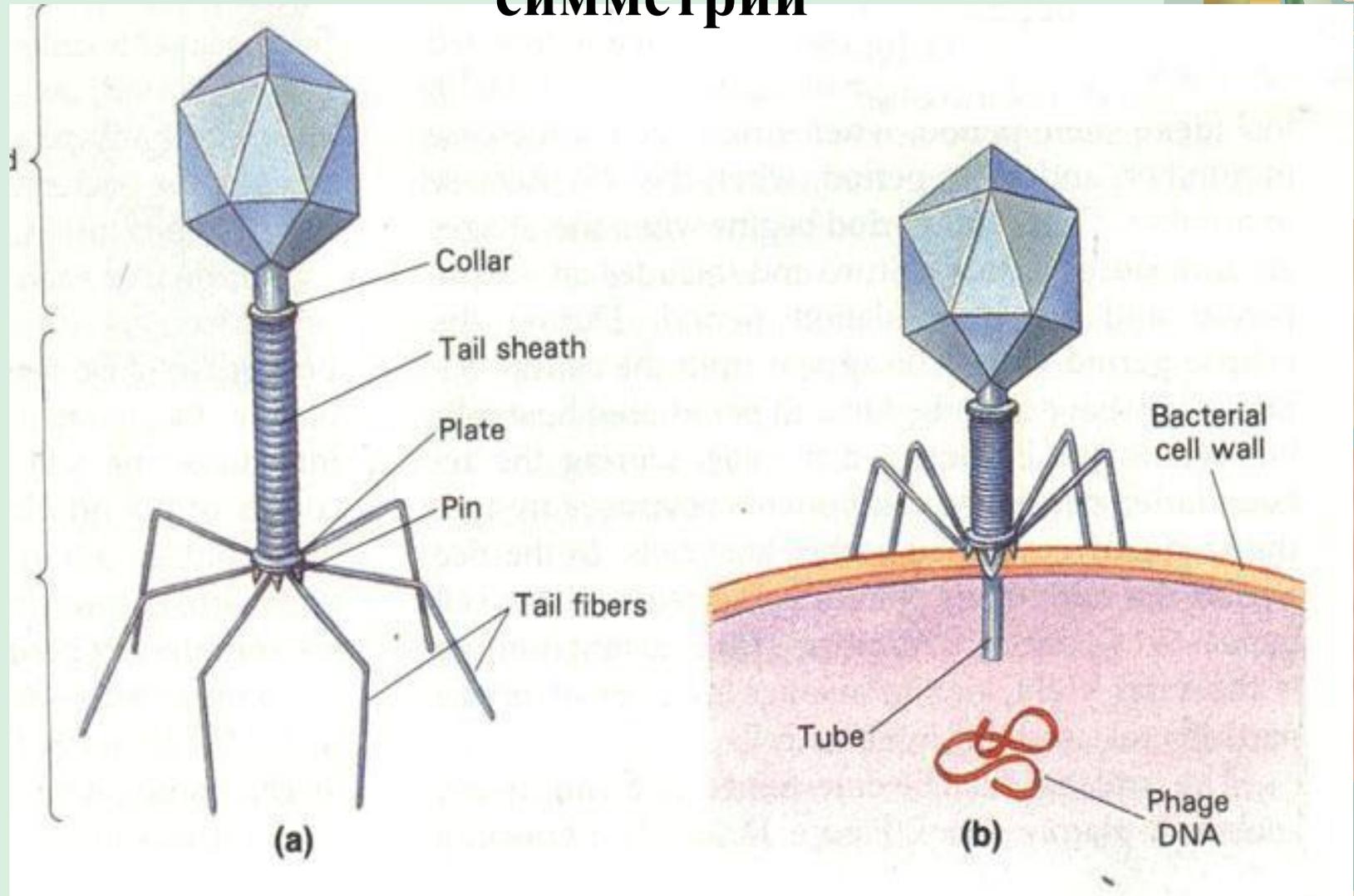


Вирусы мозаичной болезни табака

Икосаэдрический, кубический, квазисферический тип симметрии



Комбинированный (смешанный) тип симметрии



Классификация вирусов (РНК-содержащие)

Семейство вирусов	Наличие суперкапсида	Тип симметрии	Структура РНК	Вирусы патогенные для человека
Picornaviridae	Нет	Кубический	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, "плюс"	Полиовирус, риновирус, вирус гепатита А
Caliciviridae	Нет	Кубический	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, "плюс"	Вирус Норволк, вирус гепатита Е
Reoviridae	Нет	Кубический	Двухнитчатая, 10 сегментов	Реовирус, ротавирус
Flaviviridae	Да	Кубический	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, "плюс"	Вирусы клещевого энцефалита, японского энцефалита, желтой лихорадки, лихорадки Западного Нила, гепатита С
Togavirus	Да	Кубический	Однонитчатая, линейная, 2 сегменты,	Вирус краснухи

Классификация вирусов (РНК-содержащие)

Семейство вирусов	Наличие суперкапсида	Тип симметрии	Структура РНК	Вирусы патогенные для человека
Retroviridae	Да	Кубический	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “плюс”	ВИЧ, вирус Т-клеточной лейкемии человека
Orthomyxovirus	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, 8 сегментов, “минус”	Вирусы гриппа
Paramyxoviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “минус”	Вирусы парагриппа, кори, паротита, респираторно-синцитиальный вирус
Rhabdoviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “минус”	Вирус бешенства

Классификация вирусов (РНК-содержащие)

Семейство вирусов	Наличие суперкапсида	Тип симметрии	Структура РНК	Вирусы патогенные для человека
Filoviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, "минус"	Вирус Эбола, вирус Марбурга
Coronaviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, "плюс"	Коронавирусы
Arenaviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая циркулярная, 2 сегменты, "минус"	Вирус лимфоцитарного хориоменингита
Bunyavirus	Да	Спиральный	Однонитчатая циркулярная, 2 сегменты	Хантавирусы, вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, вирус геморрагической лихорадки

Классификация вирусов (РНК-содержащие)

Семейство вирусов	Наличие суперкапсида	Тип симметрии	Структура РНК	Вирусы патогенные для человека
Bornaviridae	Да	Кубический	Однонитчатая, линейная, не сегментированная, "минус"	Вирусы болезни Борна
Astroviridae	Нет	Кубический	Однонитчатая, линейная, не сегментированная, "плюс"	Астровирусы человека
Deltavirus (не классифицированный вирус)	Да	неизвестный	Однонитчатая, циркулярная, кольцо, "минус"	Вирус гепатиту Дельта

Классификация вирусов (ДНК-содержащие)

Семейство вирусов	Наличие суперкапсида	Тип симметрии	Структура ДНК	Вирусы патогенные для человека
Papovaviridae	Нет	Кубический	Двухнитчатая, циркулярна	Вирус папиломы
Adenoviridae	Нет	Кубический	Двухнитчатая, линейная	Аденовирус
Hepadnavirus	Да	Кубический	Двониткова, дефектна, циркулярна	Вирус гепатита В
Herpesviridae	Да	Кубический	Двухнитчатая, линейная	Вирус простого герпеса 1, 2, опоясывающего герпеса-ветрянки, цитомегаловирус, Эпштейна-Барр вирус
Poxviridae	Да	Смешанный	Двухнитчатая, линейная	Вирус натуральной оспы, вирус вакцины
Parvoviridae	Нет	Кубический	Однонитчатая,, линейная	Вирусы гастроэнтерита, инфекционной эритемы, гемолитической болезни

Химический состав вирусов

В состав вирусов входит нуклеиновая кислота, белок, липиды, гликолипиды, гликопротеиды.

Они всегда содержат один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), которая составляет от 1 % до 40 % массы вириона.

Вирусные геномы содержат информацию, достаточную для синтеза лишь нескольких белков. Их масса достигает 10-15 мг, что в 1 млн. раз меньше, чем в клетки, а длина- до 0,093 мм
Число нуклеотидных пар колеблется от 3150 (вирус гепатита В) до 230000 (вирус натуральной оспы).



Белки вирусов (70-90 %) разделяются на **структурные и неструктурные.**

Структурными - белки, которые входят в состав зрелых внеклеточных вирионов.

Они выполняют ряд важных функций:

- защищают нуклеиновую кислоту от внешнего повреждения взаимодействуют с мембранами чувствительных клеток обеспечивают проникновения вируса в клетку - имеют РНК- и ДНК-ПОЛИМЕ-РАЗНУЮ активность и др.



Неструктурные белки не входят в состав зрелых вирионов, однако образуются во время их репродукции.

Они:

- обеспечивают регуляцию экспрессии вирусного генома
- являются предшественниками вирусных белков, способные подавлять клеточный биосинтез.



В зависимости от расположения в вирионе, белки разделяются на **капсидные, суперкапсидные, матриксные, белки сердцевины и ассоциируемые с нуклеиновой кислотой.**



Липиды (15-35 %) содержатся в сложных вирусах и входят в состав суперкапсидной оболочки, образуя ее двойной липидный слой.

Они:

- стабилизируют вирусную оболочку
- обеспечивают защиту внутренних слоев вирионов от гидрофильных веществ внешней среды
- принимают участие у депротеинизации вирионов.

Липопротеиды - комплекс липидов клеточной мембраны и вирусных суперкапсидных белков, какие они приобретают при выделении из клетки во время репродукции.



Молекулы углеводов входят в состав гликопротеинов, гликолипидов, достигая 3,5-9%. Они играют важную роль, обеспечивая защиту соответствующих молекул от действия клеточных протеаз.



Репродукция вирусов.

Особенности ее заключаются в том, что геномы представлен как РНК, так и ДНК, они многообразны за структурой и формой, почти все вирусные РНК способны реплицироваться независимо от ДНК клетки. Вирусам присущий **дизъюнктивный** способ репродукции.

Последний заключается в том, что синтез генома и белков вируса разорван в пространстве и времени: нуклеиновые кислоты реплицируются в ядре клетки, белки - в цитоплазме, а сбор целых вирионов может происходить на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны. Репродукция вирусов - уникальная система воссоздания чужеродной информации в клетках эукариотов и обеспечивает абсолютное подчинение клеточных структур потребностям вирусов.



В репродукции вирусов выделяют ряд стадий. К **ранним** принадлежит адсорбция вирусов на поверхности клетки, проникновение (пенетрация) их внутрь клетки и их раздевание (депротеинизация).

Поздние стадии (**стратегия вирусного генома**) включают **синтез** вирусных нуклеиновых кислот, синтез белка, сбор вирионов и выход вирусных частиц из клетки.



Прикрепление вирусов к поверхности клетки обеспечивается двумя механизмами:

неспецифическим и специфическим.

Неспецифический определяется силами электростатического взаимодействия, что возникает между химическими группами на поверхности вирусов и клеток, которые несут разные заряды.

Специфический механизм (обратная и необоротная адсорбция) предопределяется комплементарными вирусными и клеточными рецепторами. Они могут иметь белковую, углеводную, липидную природу. Например, рецептором для вирусов гриппа является сиаловая кислота. Число рецепторов на участках адсорбции может достигать 3000. На поверхности вирусов рецепторы, как правило, расположены на дне углублений и щелей.



Проникновение вирусов внутрь клетки происходит за механизмом **рецепторного эндоцитоза** (вариант виропексиса) на специальных участках клеточных мембран, которые содержат особенный блок с высокой молекулярной массой - **клатрин**.

Мембраны инвагинируются, и образуются покрытые клатрином внутриклеточные вакуоли. их число может достигать 2000. Вакуоли, объединяясь, образуют **рецептосомы**, а последние сливаются с лизосомами. Поверхностные белки вирусов взаимодействуют с мембранами лизосом, а их нуклеопротеид выходит в цитоплазму.



Однако существует еще один механизм проникновения вирусов в клетку - **индукция слияния мембран**. Она происходит благодаря особенному вирусному **белку слияния** (F- от fusion - слияние). В результате этого процесса вирусная липопротеидная оболочка интегрирует с клеточной мембраной, а геном его проникает в клетку. Такой белок идентифицирован у вирусов гриппа, парагриппа, рабдовирусов и др.



Раздевание вирионов - многостепенный процесс, во время которого высвобождается их нуклеиновый аппарат, исчезают защитные оболочки, которые тормозят экспрессию генома. Происходит оно в специализированных участках - лизосомах, аппарате Гольджи.



Поздние стадии репродукции направлены на синтез вирусных нуклеиновых кислот и белка.

Механизм **репликации** (образование вирусных геномов, которые являются точной копией предшественника) зависит от особенностей нуклеиновой кислоты. У разных видов вирусов он неодинаковый.

Выделяют 6 основных классов репликации вирусов.



У **двухнитчатых ДНК-СОДЕРЖАЩИХ** вирусов (герпесвирусы, аденовирусы, вирусы натуральной оспы) сначала происходит деспирилизация ДНК и расхождение ее нитей. На одной из них по принципу комплементарности синтезируется новая нить ДНК, на второй - информационная (матричная) РНК (ИРНК или МРНК). Этот процесс длится, пока в клетках не образуется достаточное количество нуклеиновых кислот. У **однонитчатых ДНК-ГЕНОМНЫХ** вирусов процесс происходит при условии образования промежуточной формы ДНК.



Репликация у вирусов, которые содержат РНК, происходит за подобными закономерностями. На материнской РНК синтезируется ИРНК, а матрицей для синтеза вирусного генома служат промежуточные формы РНК.



Существенно отличается от предыдущих механизм репликации ретровирусов (онкорнавирусов). Их процесс репродукции тесно связан с репродукцией хозяина клетки.

Сначала на РНК-вместительном геноме вируса происходит синтез нити ДНК с помощью РНК-зависимой ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ. За время некоторый синтезируется комплементарна нить ДНК, которая в дальнейшем интегрирует в геном хозяина клетки. В таком состоянии вирус длительное время сохраняется в клетке. Позже эта нить ДНК служит матрицей для образования вирусной РНК.



Транскрипцией называют процесс образования информационных (матричных) РНК.

Она происходит с помощью специальных ферментов, которые называются ДНК- или РНК-зависимые РНК-полимеразы.

У вирусов ДНК эти ферменты клеточного происхождения, а у РНК-вирусов - собственные вирусспецифические транскриптазы.



На стадии **трансляции** происходит считывание генетической информации из матричной РНК и перевод ее в последовательность аминокислот. Происходит процесс в рибосомах. Молекулы РНК продвигаются в рибосомах в соответствии с последовательностью триплетного кода, который распознают транспортные РНК. Последние несут на специальных участках аминокислоты.



Сборка вирионов - не до конца изученный процесс. В его основе лежит возможность специфического распознавания нуклеиновых кислот и вирусных белков при достижении их определенной концентрации. Подсчитано, что для образования одной вирусной частицы необходимо возле 10 тысяч молекул белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот. Простые вирионы складываются на мембранах эндоплазматического ретикулума. У сложных вирусов он начинается в аналогичных участках, а заканчивается на цитоплазматической мембране.

Простые вирусы оставляют клетку, как правило, путем «взрыва», разрывая ее мембрану.

Сложные вирусы - **почкованием**. При этом клетка длительное время может оставаться жизнеспособной, пока полностью не истощится, продуцируя вирусных потомков.

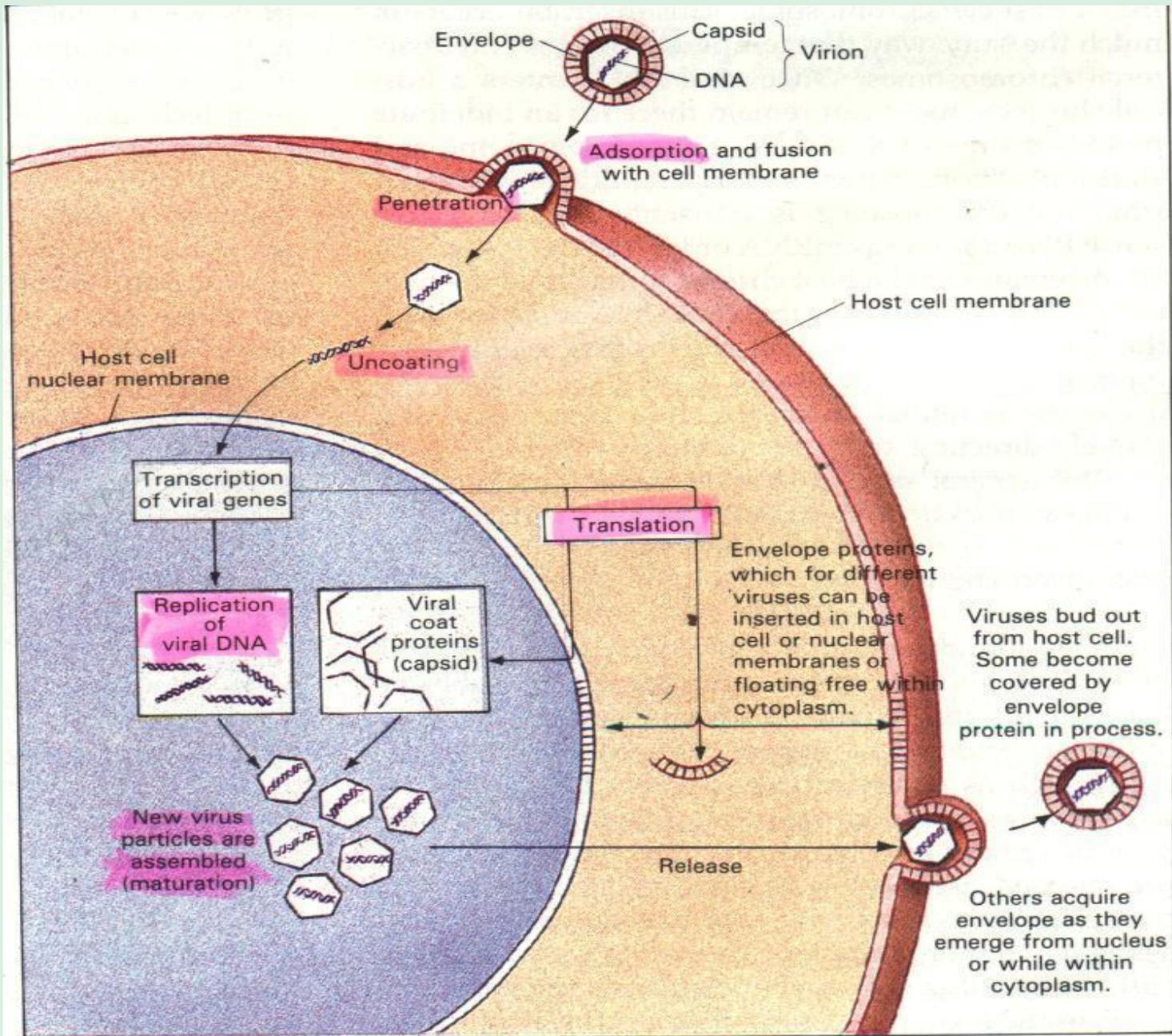


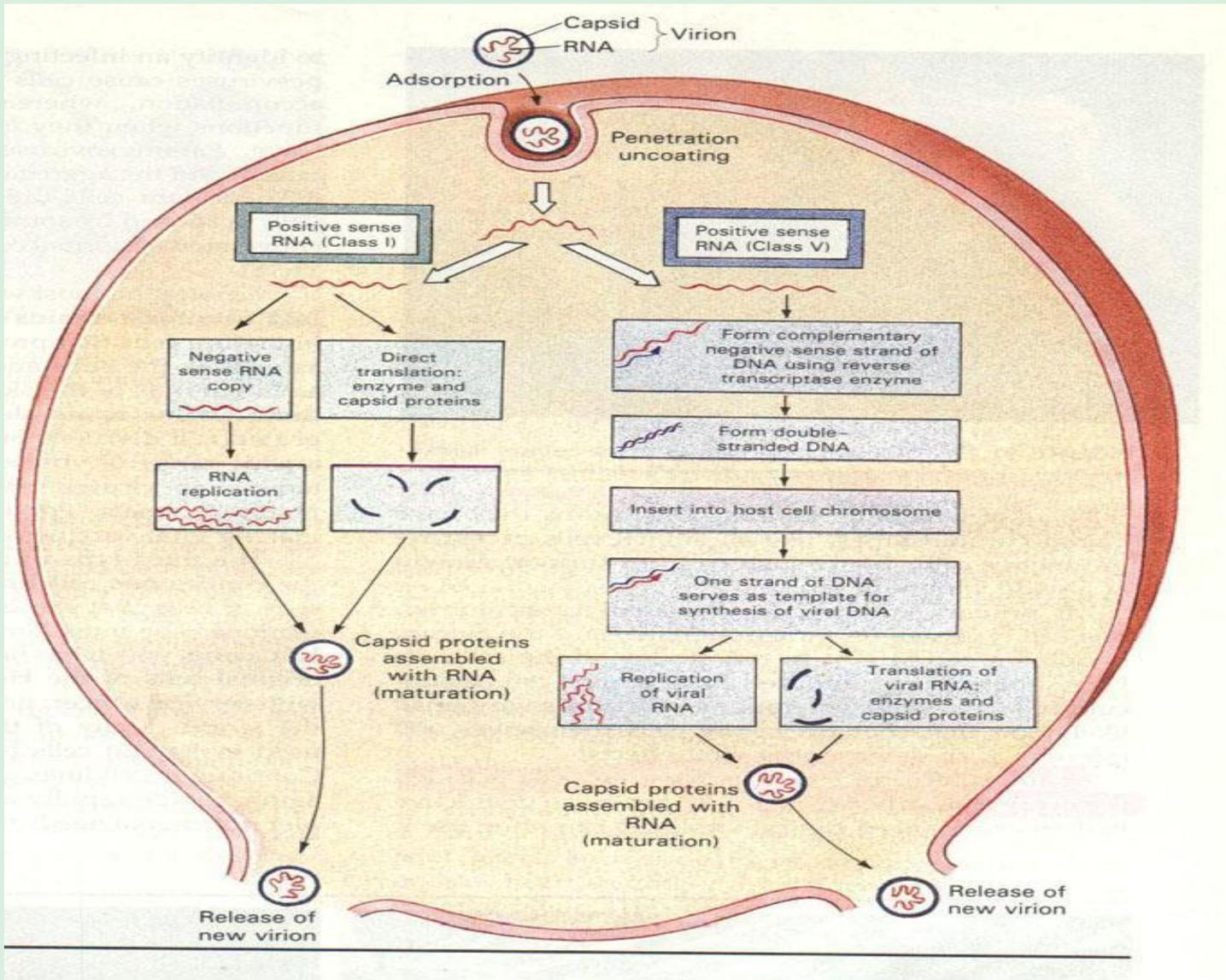
Типы вирусной инфекции

При **производительной инфекции** вирус функционирует в клетке автономно, а его репродукция происходит независимо от репродукции клеточного генетического аппарата. При этом образуется новое поколение вирулентных вирусов. Если цикл репродукции вирусов блокируется на одной из стадий, а инфекционные вирионы не образуются, такой тип взаимодействия обозначают как **абортивный**.

Когда с клеткой взаимодействуют онкогенные РНК-вместительные вирусы (возбудители СИДа, лейкоза), нуклеиновая кислота интегрируется в клеточную хромосому и существует там в виде **провируса**. В результате может произойти изменение наследственных свойств клетки. Такой тип взаимодействия называют **виrogenиею**. Вирусы, которые вызывают виrogenию, принадлежат к группе **умеренных**.







Определение размеров вирусов

Фильтрация

Седиментация в ультрацентрифуге

Наблюдение в электронном микроскопе

Сравнительные размеры:

Staphylococcus имеет диаметр 1000 nm.

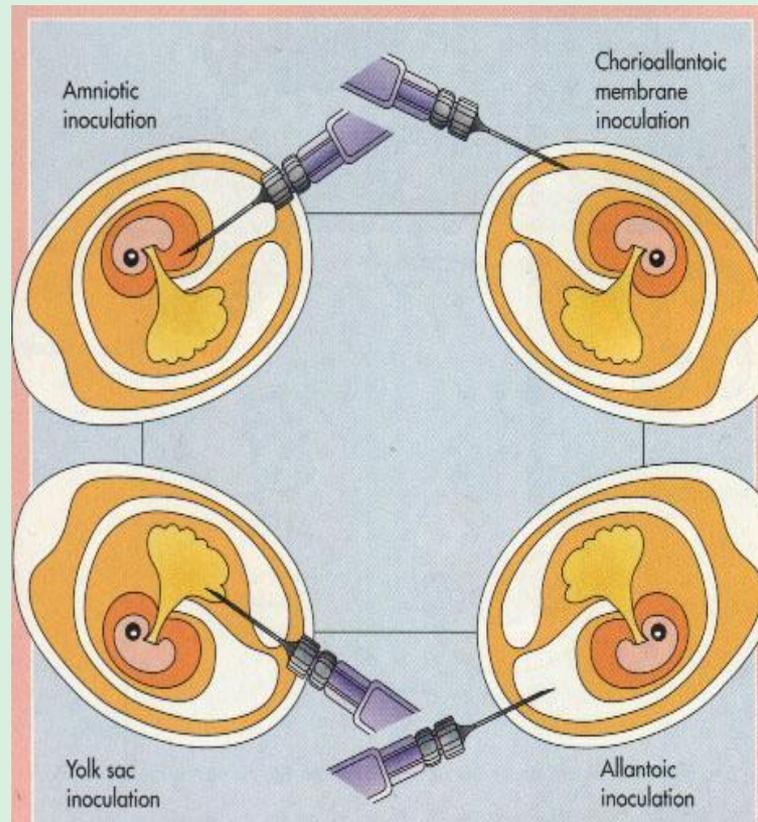
Бактериофаги - 10-100 nm.

Диаметр молекулы сывороточного альбумина 5 nm
глобулина - 7 nm, гемоглобин (23 nm).



Культивирование вирусов

**Куриные эмбрионы
6-12 дневного
возраста.
Способы заражения -
открытый, закрытый**



Культивирование вирусов

Культуры клеток: - первично-трипсинизированные культуры эмбрионов человека, почек мартышек, фибробластов эмбриона курицы и тому подобное; способные расти на протяжении нескольких пассажей как вторичные культуры; перевиваемые клетки; они представляют собой культуры клеток, которые приобрели способность к неограниченному росту и размножению; Их получают из опухолей или из нормальных человеческих или животных тканей, которые имеют измененный кариотип. HeLa (карцинома шейки матки) Нер-2 (карцинома гортани человека), KB (карцинома ротовой полости человека), RD (рабдомиосаркома человека), RH (почка эмбриона человека), Vero (почка зеленой мартышки), СПЭВ (почка эмбриона свиньи), ВНК-32 (почка сирийского хомяка)



Культуры клеток

диплоидные клетки; они представляют собой культуры клетки одного типа, имеют диплоидный набор хромосом и способны выдерживать при этом до 100 пересеваний в условиях лаборатории. Они являются удобной моделью для получения вакцинных препаратов вирусов, так как свободные от контаминации инородными вирусами, хранят исходный кариотип во время пассажей, не имеют онкогенной активности. Чаще всего пользуются линиями культур, которые получены с фибробластов эмбриона человека (WI-38, MRC-5, MRC-9, IMR-90), коров, свиней, овец и тому подобное. Культуры клеток хранят в замороженном состоянии.



Питательные среды, которые используются для поддержки культур клеток или их роста бывают естественными или синтетическими (искусственными).

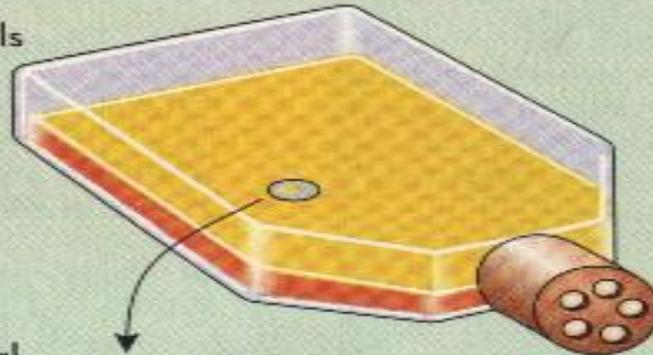
Естественные среды - сыворотка крови крупного рогатого скота, жидкости из серозных полостей, продукты гидролиза молока, многообразные гидролизаты (5 % гемогидролизат, 0,5 % гидролизат лактоальбумина) или экстракты тканей. Их химический состав помогает создать условия, какие подобные к тем, что существуют в организме человека. Существенным недостатком таких сред считается их нестандартность, ведь качественный и количественный состав компонентов, которые входят к их составу, может изменяться.



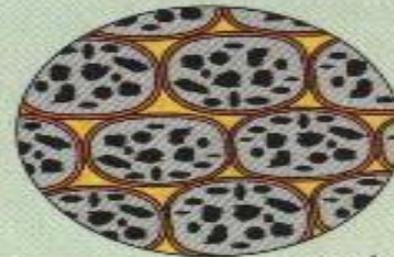
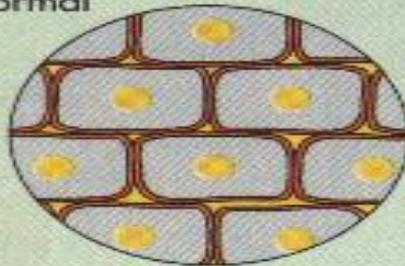
Синтетические питательные среды не имеют этого недостатка, ведь их химический состав стандартен, потому что их получают комбинируя многообразные солевые растворы (витамины, аминокислоты) в искусственных условиях. К таким наиболее употребимым растворам принадлежат среда 199 (культивирование первинно-трипсинизированных и перевиваемых культур клеток), среда Игла (содержит минимальный набор аминокислот и витаминов и используется для культивирования диплоидных линий клеток и перевиваемых), среда Игла MEM (культивирование особенно требовательных линий клеток), раствор Хенкса, что используется для изготовления питательных сред, отмывания клеток и тому подобное.



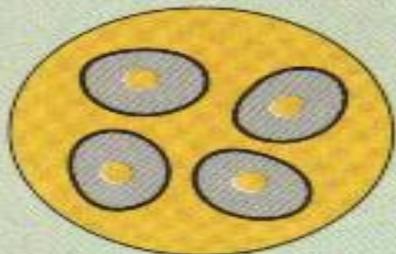
Virus-infected cells



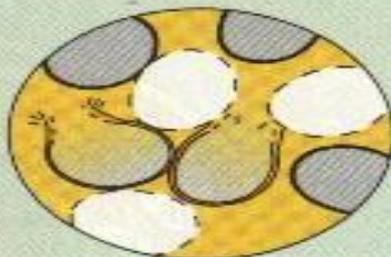
Normal



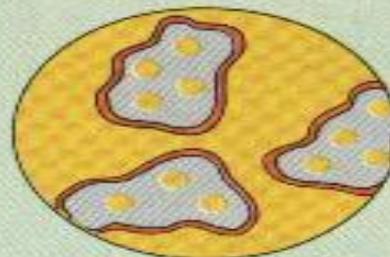
Inclusion body formation



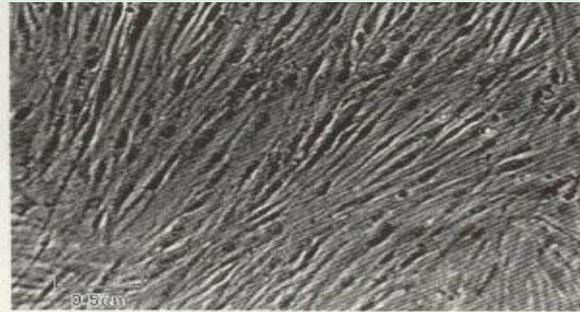
Cell rounding, detachment



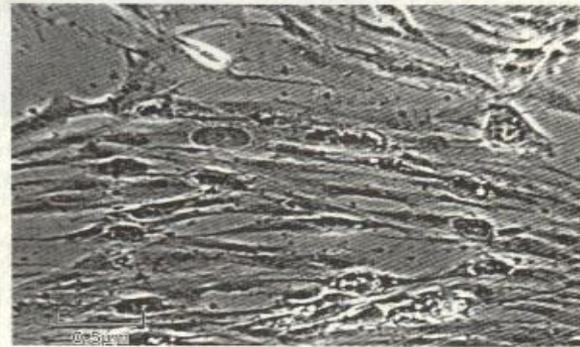
Cell lysis



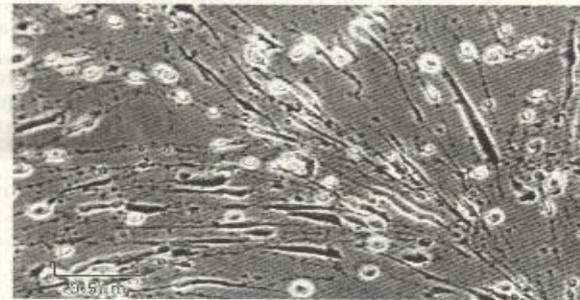
Fused cells



(a)



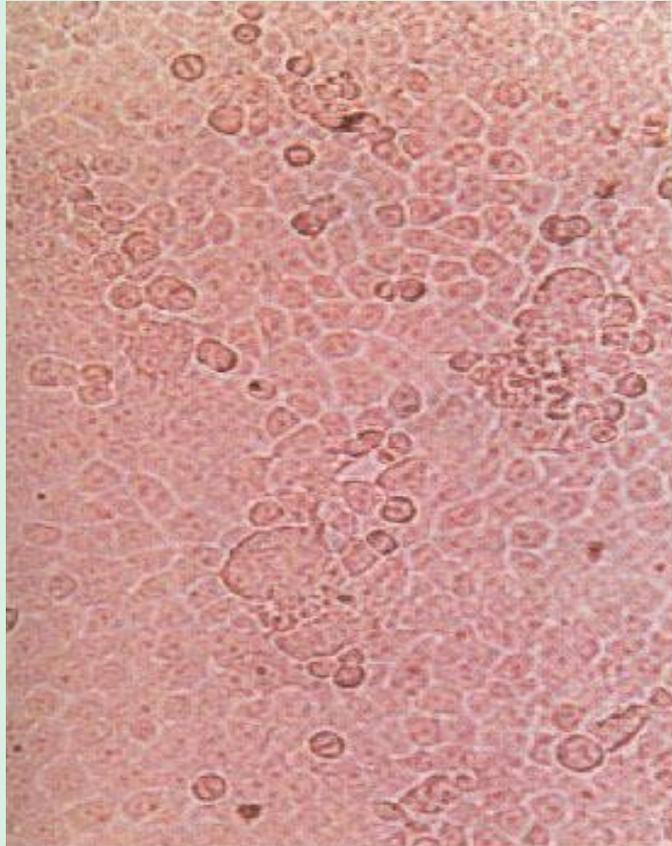
(b)



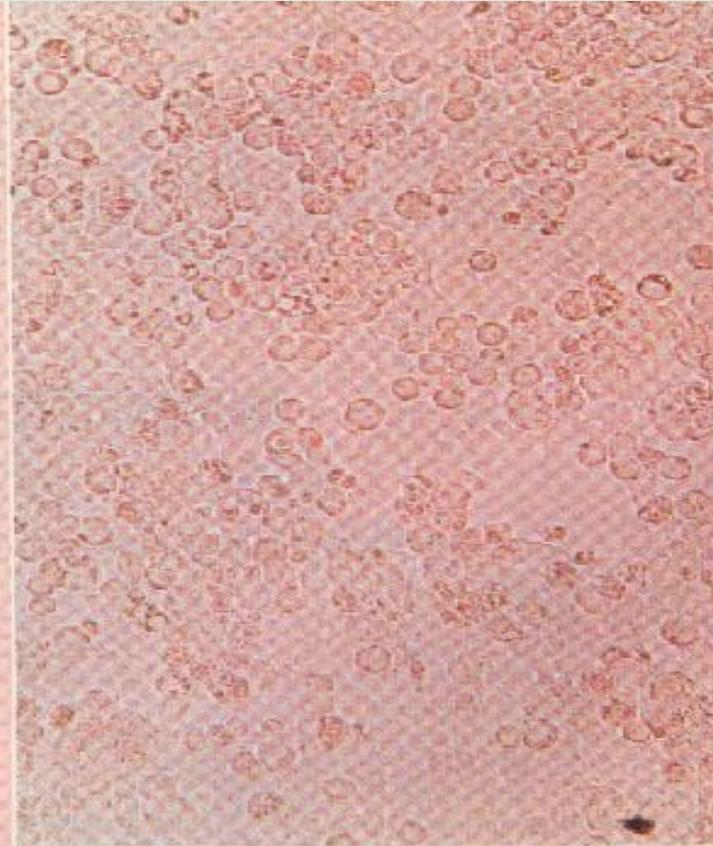
(c)

Figure 13.17

Cytopathic effects of virus infection on tissue culture. (a) Fetal tonsil diploid fibroblasts, uninfected. (b) Same cells infected with adenovirus. (c) Same cells infected with herpes simplex virus. Note that the monolayer is totally destroyed.



B3, Light micrograph showing the cytopathic effect on Ep-2 cells grown in tissue culture by an infection with adenovirus.



B4, Light micrograph showing the cytopathic effect on HEp-2 cells grown in tissue culture by an infection with respiratory syncytial virus.



Заражение лабораторных животных.

Многочисленные лабораторные животные широко используются в вирусологии для выделения и идентификации вирусов, получения специфических противовирусных сывороток, изучения многообразных аспектов патогенеза вирусных заболеваний, разработки способов борьбы с заболеваниями и их профилактики. Чаще всего используют белых мышей разного возраста (двухдневного возраста), белых крыс, гвинейских свинок, кролей, сусликов, хлопчатниковых крыс, мартышек и других.



Существуют многообразные способы заражения животных в зависимости от тропизма вирусов, клинической картины заболевания и тому подобное.

Исследуемый материал можно вводить:

- через рот
- в дыхательные пути (ингаляторно, через нос)
- накожный
- внутрикожно
- подкожно, внутримышечный
- внутривенно
- внутрибрюшинно
- внутрисердечно
- на скарифицированную роговицу
- в переднюю камеру глаза
- В МОЗГ.

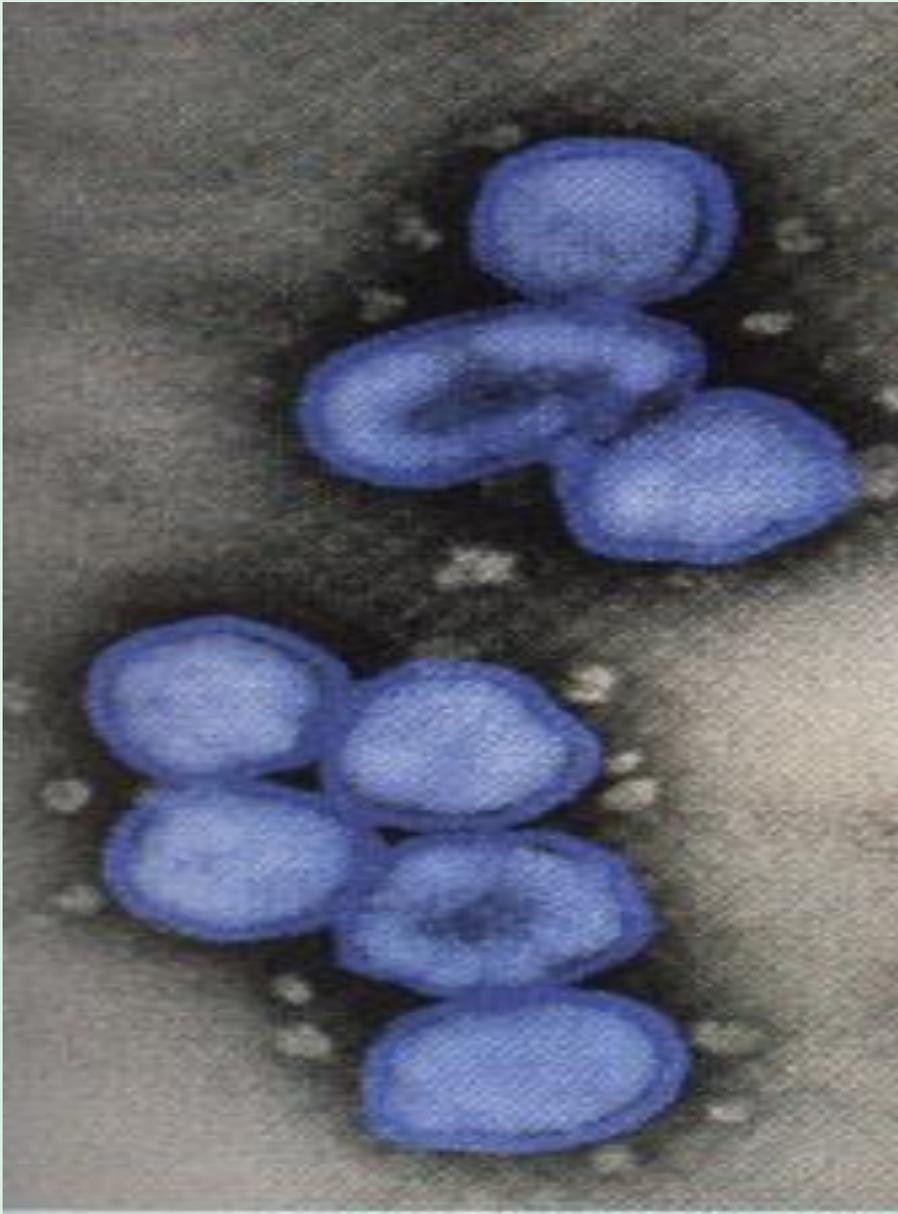


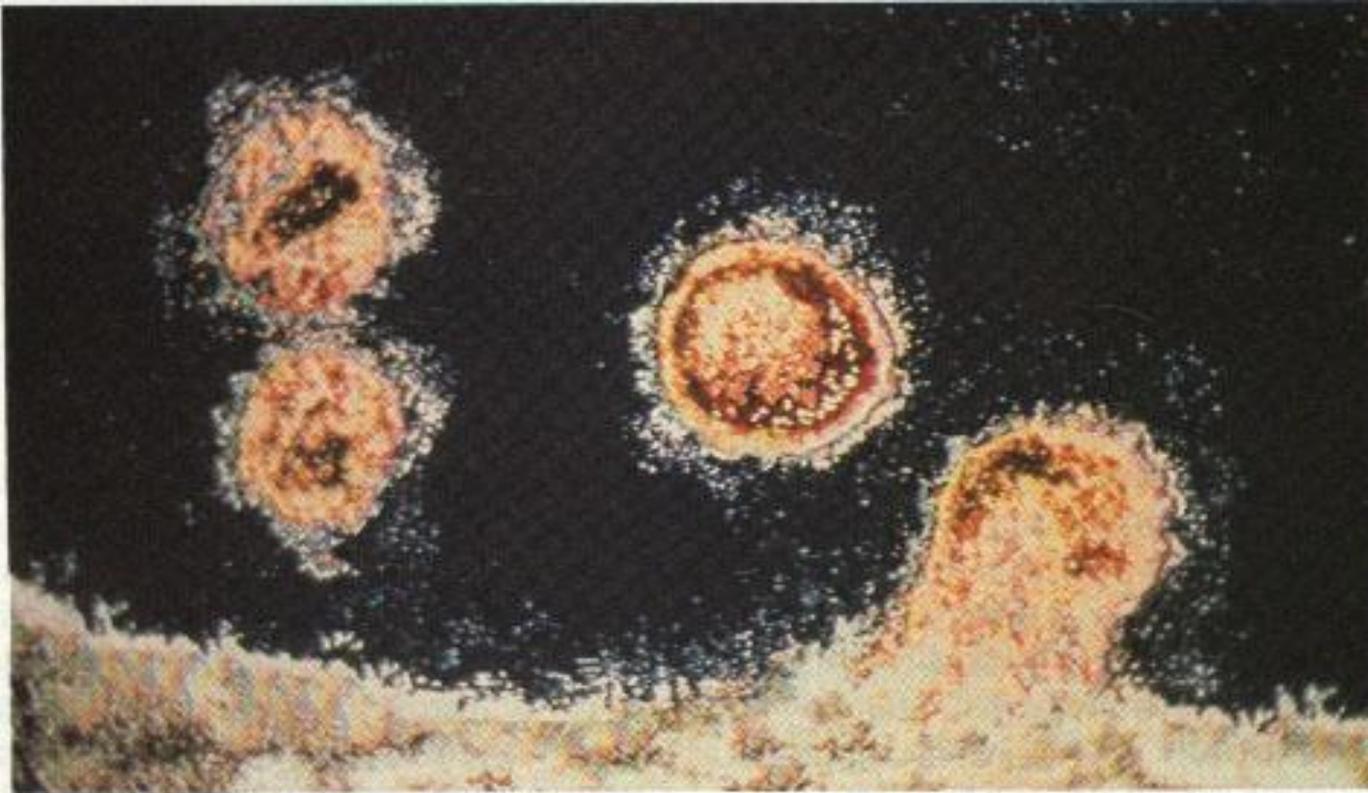
Для выделения вирусов простого герпеса, натуральной оспы используют заражение лабораторных животных (кроликов) на скарифицированную роговицу глаза.

При исследовании вирусов гепатита А вводят исследуемый материал через рот.

При выделении вирусов с нейротропными свойствами, таких как арбовирусы, вирусы бешенства, полиомиелита, Коксаки целесообразно заражать белых мышей (1-2-дневных сосунков) в МОЗГ.

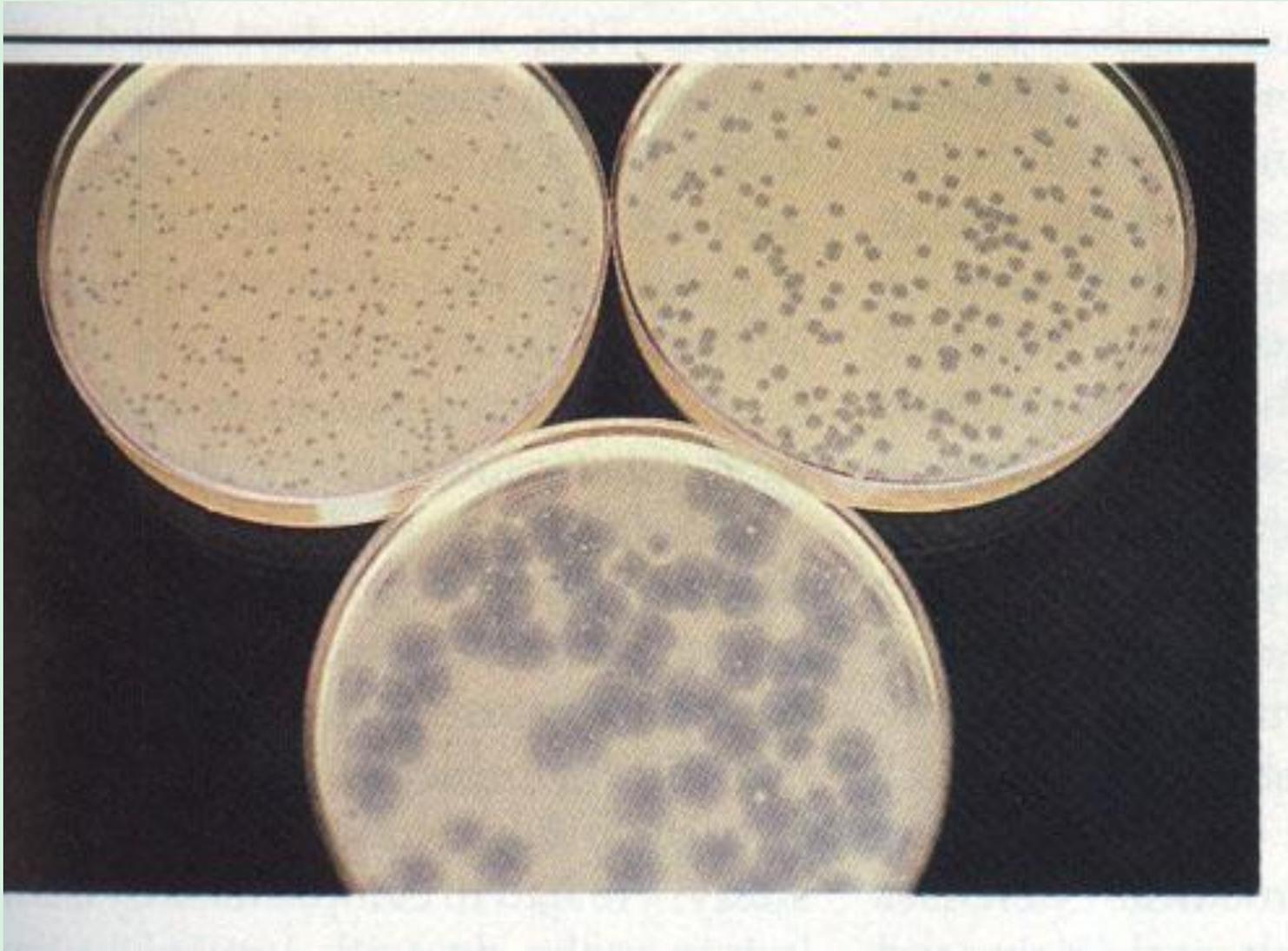


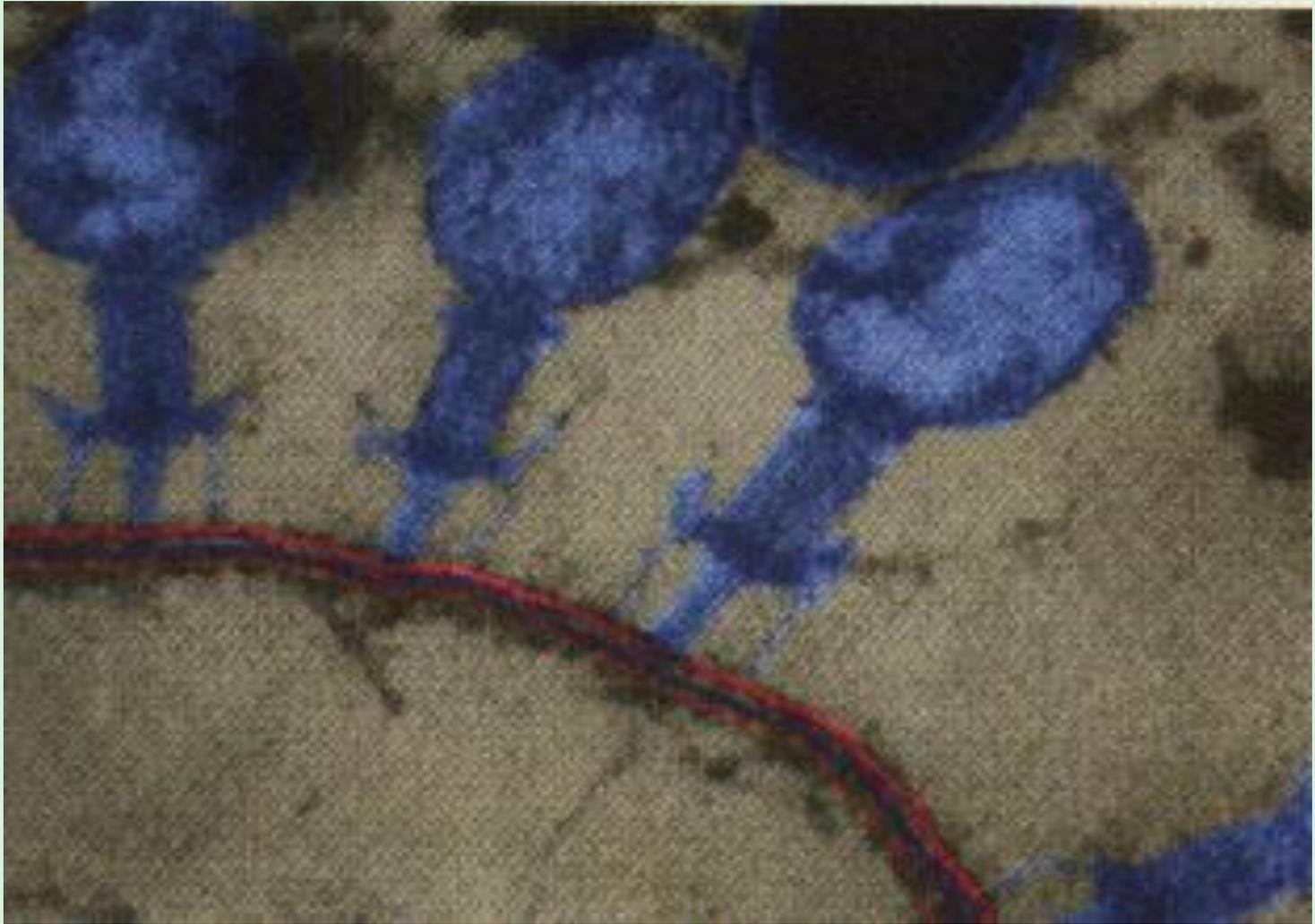


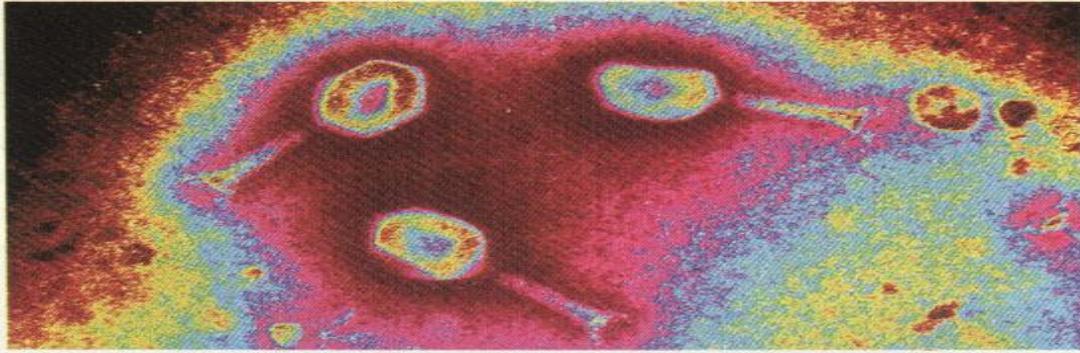


3. 9-22 Colorized electron micrograph of the human immunodeficiency virus (HIV) that causes AIDS budding from the host cell that produced it.





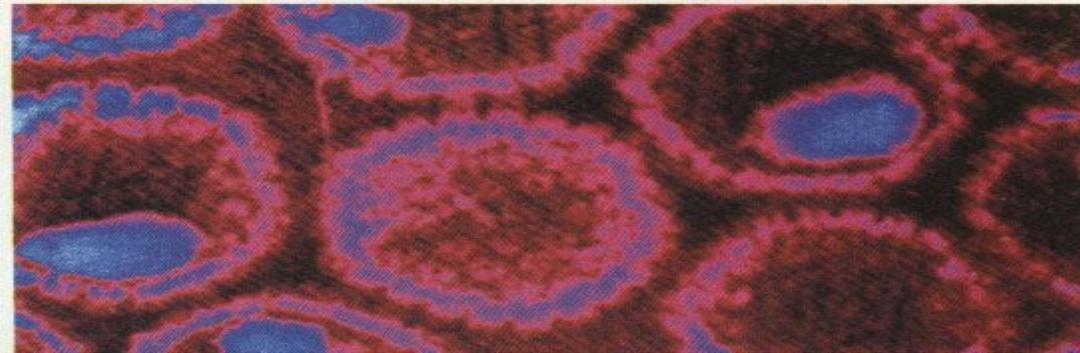




(a)



(e)



Цитопатическое действие

1. *Полная дегенерация* клеточного монослоя. Отдельные клетки, которые остаются живыми, изменяют свою морфологию, у них заметный пикноз ядра и цитоплазмы. (пикорнавирусы - вирусы полиомиелита Коксаки, ЕСНО).
2. *Симпластообразующий* тип ЦПД (возбудители кори, эпидемического паротита, парагриппа, респираторно-синцитиальных вирусов). Возникают многоядерные гигантские клетки (симпласты или синцитии).
3. *Круглоклеточная дегенерация* (аденовирусы).
При репродукции риновирусов образуются округлые клетки, которые имеют отростки, а при размножении герпесвирусов наблюдается формирование подобных клеток одинакового размера, которые разбросаны по всему монослою.
4. *Проллиферативный* тип изменений (онкогенные вирусы) - формирование нескольких слоев клеток.



5. Отдельные вирусы не способны вызывать видимых дегенеративных проявлений со стороны клеток. В таких случаях для их выявления используют феномен интерференции, при котором клеточные культуры параллельно заражают другими вирусами, способными вызывать ЦПД

(вирусы краснухи, крымской геморрагической лихорадки).

6. Образование внутриклеточных включений: внутриядерные и внутрицитоплазматические. Такие включения образуют вирусы бешенства (тельца Бабеша-Негри), натуральной оспы (тельца Гварниери), простого герпеса (тельца Липшютца), аденовирусы, вирусы гриппа и другие.

7. Адсорбция эритроцитов (вирусы парагриппа)

8. Повреждение цитоскелета клетки

