

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСОВ

Способы культивирования вирусов

- куриный эмбрион
- культура клеток
- организм лабораторного животного



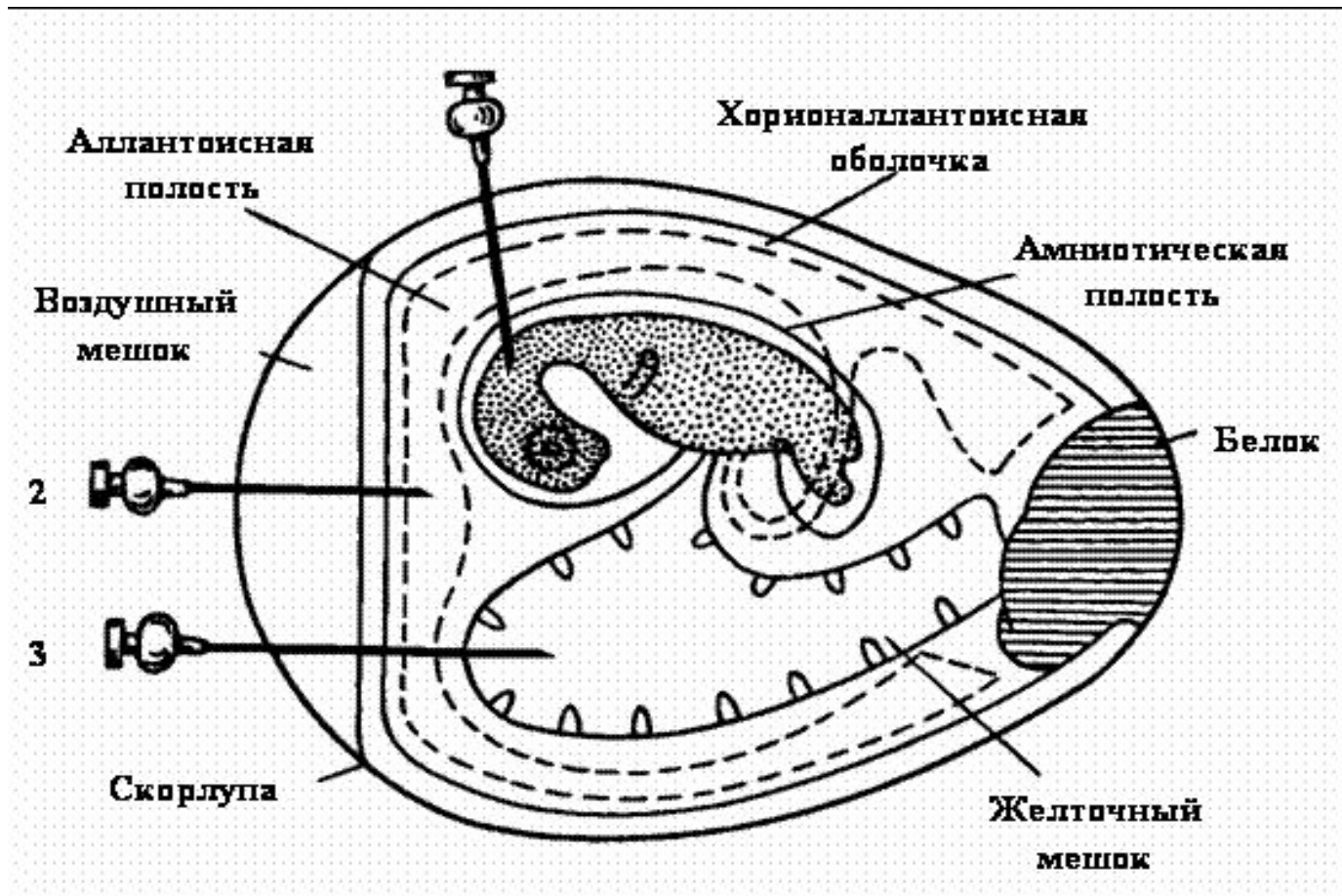
обнаружение наличия вируса
(индикация)



определение типа вируса
(идентификация)

Использование для вирусологического метода куриного эмбриона

5-7-дневные, реже – 10-11-дневные



Основные способы заражения куриных эмбрионов

- на хорион-аллантаисную оболочку
- в хорион-аллантаисную полость
- в полость желточного мешка
- в полость амниона
- в тело эмбриона

Обнаружение вирусов в курином эмбрионе

- **индикация:**

- гибель эмбриона
- морфологические изменения эмбриона/оболочек
- РГА с жидкостью из полостей куриного эмбриона

- **идентификация:**

- РН (в т.ч. РТГА)
- РСК

Использование культур клеток

- ▣ **Культуры клеток** = соматические или эмбриональные клетки человека или животных, культивируемые в лабораторных условиях.
- ▣ **Подразделяют по числу жизнеспособных генераций на:**
 - первичные,
 - перевиваемые,
 - полуперевиваемые.

Первичные культуры клеток

- получают из тканей (**эмбриональных или нормальных**) многоклеточных организмов. Такие клетки не способны к делению – используются однократно.
- В основе получения **лежит обработка протеолитическими ферментами** (трипсином) = первично-трипсинизированные.
- Н-р, эмбриональная ткань человека, почечная ткань эмбрионов человека и обезьян.

Перевиваемые культуры клеток

- ▣ **Перевиваемые** = стабильные = готовят из опухолевых клеток, способных длительно размножаться in vitro не меняя своих свойств.
- ▣
- ▣ Н-р, HeLa – выделены из карциномы шейки матки,
- ▣ Нер-2 – из карциномы гортани,
- ▣ Нер-3 – лимфокарцинома,
- ▣ KB – эпидермоидная карцинома полости рта,
- ▣ Детройт-6 – костный мозг больного раком легкого.
- ▣

Полуперевиваемые культуры клеток

- – диплоидные клетки различных тканей и органов, способные к ограниченному размножению *in vitro*.
- Они сохраняют свои свойства в течение 20-50 пассажей (пересевов) = до года.
- При культивировании не претерпевают злокачественного перерождения – преимущество перед перевиваемыми → могут использоваться в производстве вакцин.

Преимущества перевиваемых культур клеток перед первичными:

- продолжительность культивирования – десятки лет,
- высокая скорость размножения,
- меньшая трудоемкость,
- сохраняют свои свойства в замороженном состоянии много лет,
- возможность использования международных линий культур.
- **Но:** злокачественный характер и возможность мутаций ограничивает применение для производства вакцин.

Использование культур клеток

Чаще – перевиваемые монослойные

- **индикация:**

- ЦПД (цитопатическое действие вирусов – любое изменение клеток монослоя, включая бляшкообразование и цветную пробу)
- гемадсорбирующая активность монослоя (РГАдс)
- РИФ (= идентификация)

- **идентификация:**

- РН (в т.ч. РТГАдс)
- РСК
- РИФ

Условия культивирования клеток:

- Питательные среды сложного **состава** (среда 199, Игла), сод-т источники энергии (глюкозу), минеральные вещества, аминокислоты, витамины, сыворотку крови, факторы роста.
- Клетки чувствительны к изменениям **pH** – для контроля pH добавляют индикатор и буферные растворы.
- Соблюдение правил **асептики**.
- Использование лабораторной **посуды из нейтрального стекла** – пробирки, флаконы, матрасы (=флакон 4-х гранной формы)
- Добавление **антибиотиков** к питательной среде для подавления роста бактерий
- Соблюдение **оптимальной температуры** культивирования (36-38,5°).

Условия культивирования клеток:

- Питательные среды сложного **состава** (среда 199, Игла), содержат источники энергии (глюкозу), минеральные вещества, аминокислоты, витамины, сыворотку крови, факторы роста.
- Клетки чувствительны к изменениям **pH** – для контроля pH добавляют индикатор и буферные растворы.
- Соблюдение правил **асептики**.
- Использование лабораторной **посуды из нейтрального стекла** – пробирки, флаконы, матрасы (=флакон 4-х гранной формы)
- Добавление **антибиотиков** к питательной среде для подавления роста бактерий
- Соблюдение **оптимальной температуры** культивирования (36-38,5°).

Обнаружение = индикация вирусов в культуре клеток

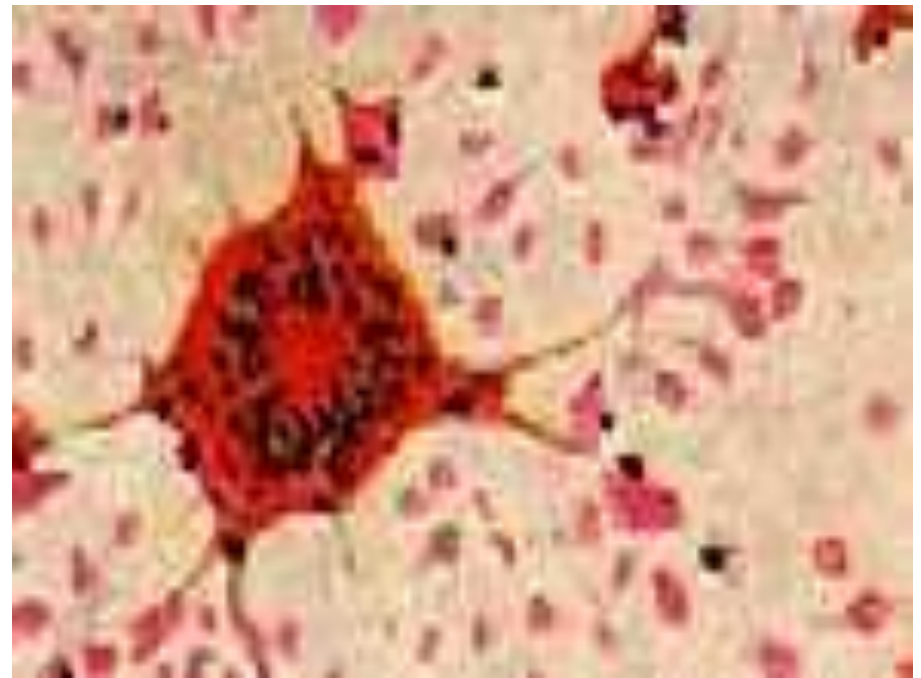
- проводят на основе следующих феноменов:
 - цитопатогенного действия (ЦПД) вирусов или цитопатического эффекта,
 - образования внутриклеточных включений,
 - образования “бляшек”,
 - реакции гемагглютинации, гемадсорбции или “цветной” реакции.

ЦПД = видимые под микроскопом морфологические изменения клеток (вплоть до их отторжения от стекла), возникающие в результате внутриклеточной репродукции вирусов

Культура клеток



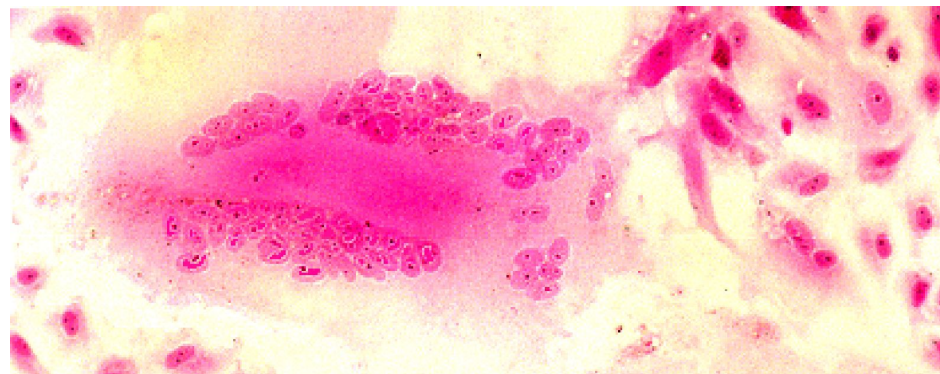
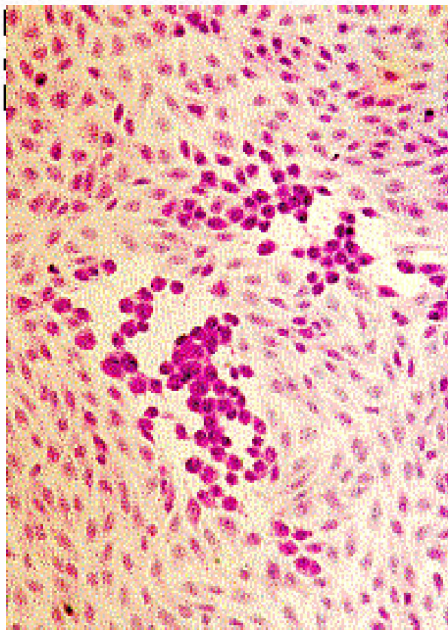
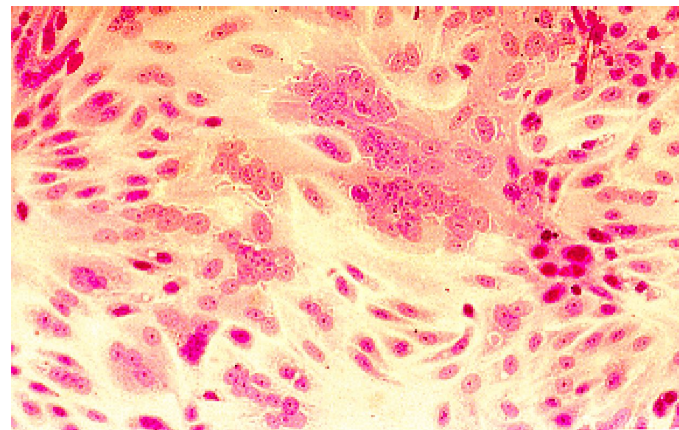
ЦПД вируса



Виды ЦПД

- округление и сморщивание клеток – пикорнавирусы,
- нарастающая деструкция – герпесвирусы,
- пролиферация (образование дырок) – поксвирусы,
- образование гигантских многоядерных клеток = симпласты – парамиксовирусы.

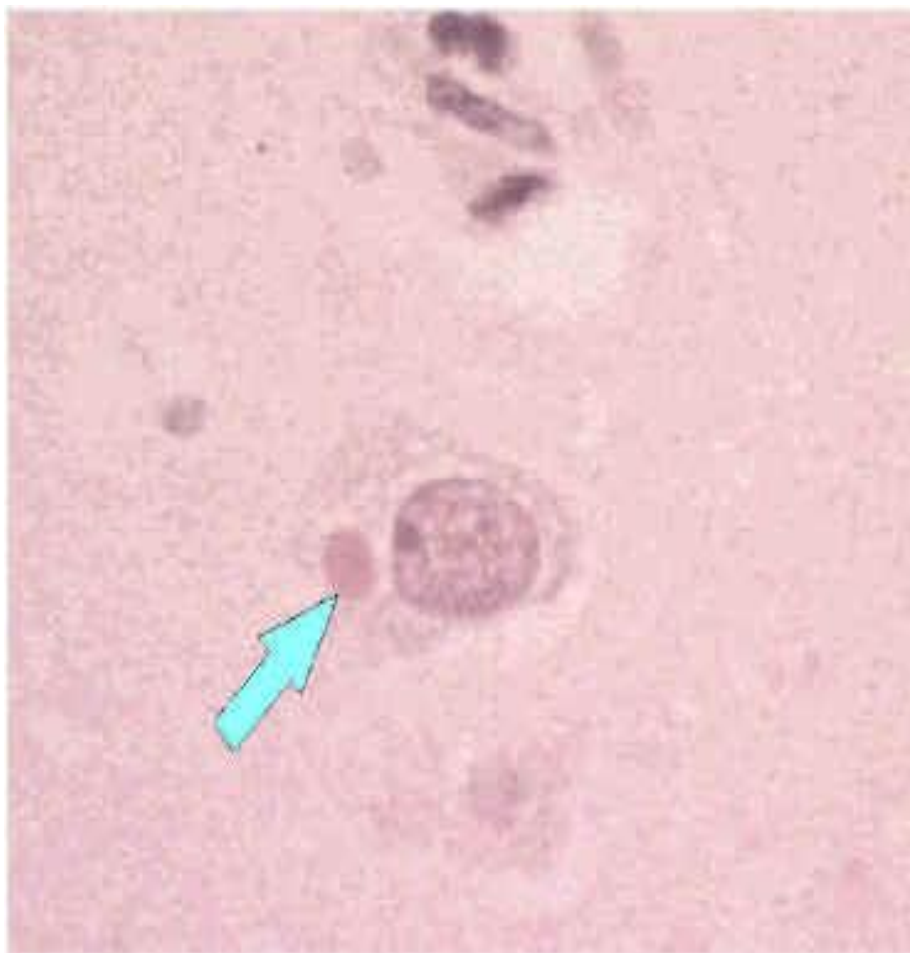
ЦПД вирусов



Включения

- = скопление вирионов или отдельных их компонентов в цитоплазме или ядре клеток, выявляемые под микроскопом при специальном окрашивании.
- Н-р, вирус натуральной оспы образует цитоплазматические включения - **тельца Гварниери**;
 - вирус бешенства в цитоплазме образует **тельца Бабеша-Негри**,
 - вирусы герпеса и аденовирусы - **внутриядерные включения**.

Тельца Бабеша-Негри



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.

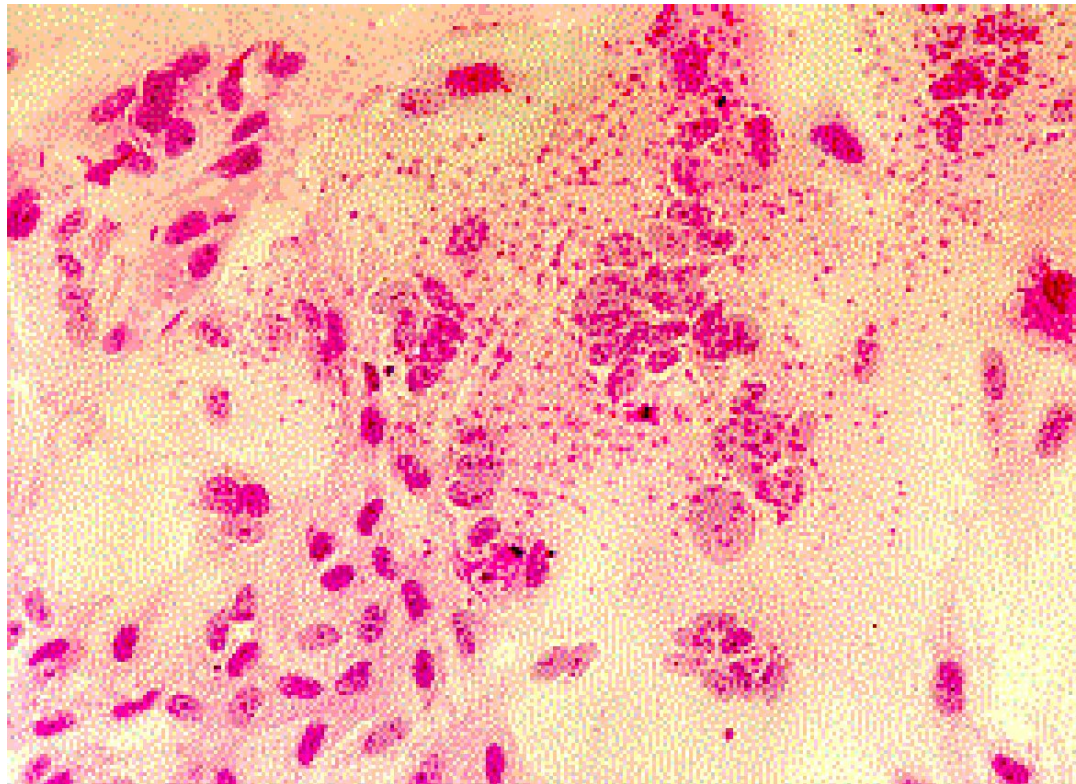
- Один вирион образует потомство в виде одной бляшки.
- “Негативные” колонии разных вирусов отличаются по размеру, форме, поэтому метод бляшек используют для дифференциации вирусов, а также для определения их концентрации.

Реакция гемагглютинации (РГА)

- основана на способности некоторых вирусов вызывать агглютинацию (склеивание) эритроцитов за счет вирусных гликопротеиновых шипов – гемагглютининов.

Реакция гемадсорбции

=РГАдс = способность культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты.



Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

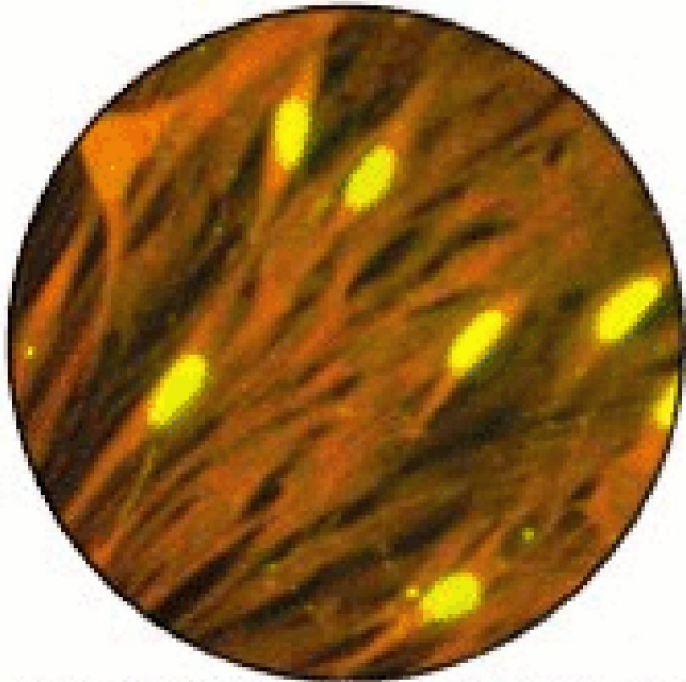


Fig. 2, CMV centrifugation culture fixed and stained 16 hrs after inoculation showing viral proteins in nuclei of infected human fibroblast cells

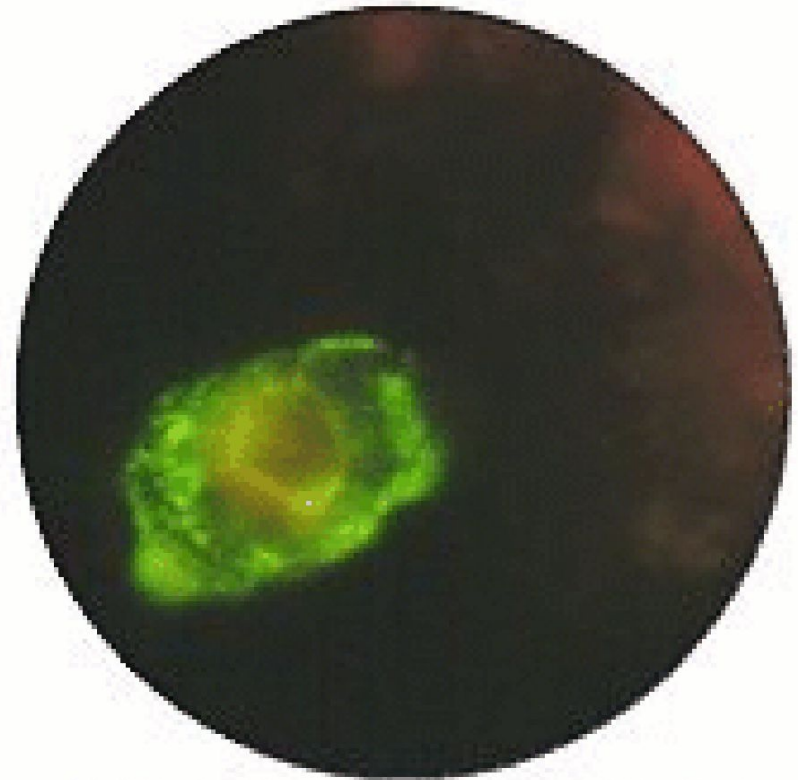


Fig. 3, HSV-infected epithelial cell from skin lesion (DFA)

Использование лабораторных ЖИВОТНЫХ

**взрослые или новорожденные белые мыши,
хомяки, кролики, обезьяны**

применяется для выделения тех вирусов,
которые плохо репродуцируются в культуре
клеток или курином эмбрионе,

Вид и способ заражения – от вируса

- ▣ **индикация:**
 - заболевание животного
 - его гибель
- ▣ **идентификация:**
 - РН

Способы заражения лабораторных животных

- интраназально,
- подкожно,
- внутримышечно,
- внутрибрюшинно,
- интрацеребрально,

Обнаружение вируса при заражении лабораторных ЖИВОТНЫХ

■ **обнаруживают** вирус по:

- развитию видимых клинических проявлений – параличи – рабдовирусы,
- патоморфологическим изменениям органов и тканей – пикорна-, тогавирусы
- в реакции гемагглютинации с суспензией из органов,

■ **недостаток:**

- высокая вероятность контаминации организма животных посторонними микробами,
- необходимость заражения культуры клеток для выделения чистой культуры вируса.

Прионы

- – белковые молекулы, способные вызывать разрушение клеток организма человека и животных.
- Они характеризуются устойчивостью:
 - к высоким температурам,
 - ионизирующей радиации,
 - ультрафиолету.
-

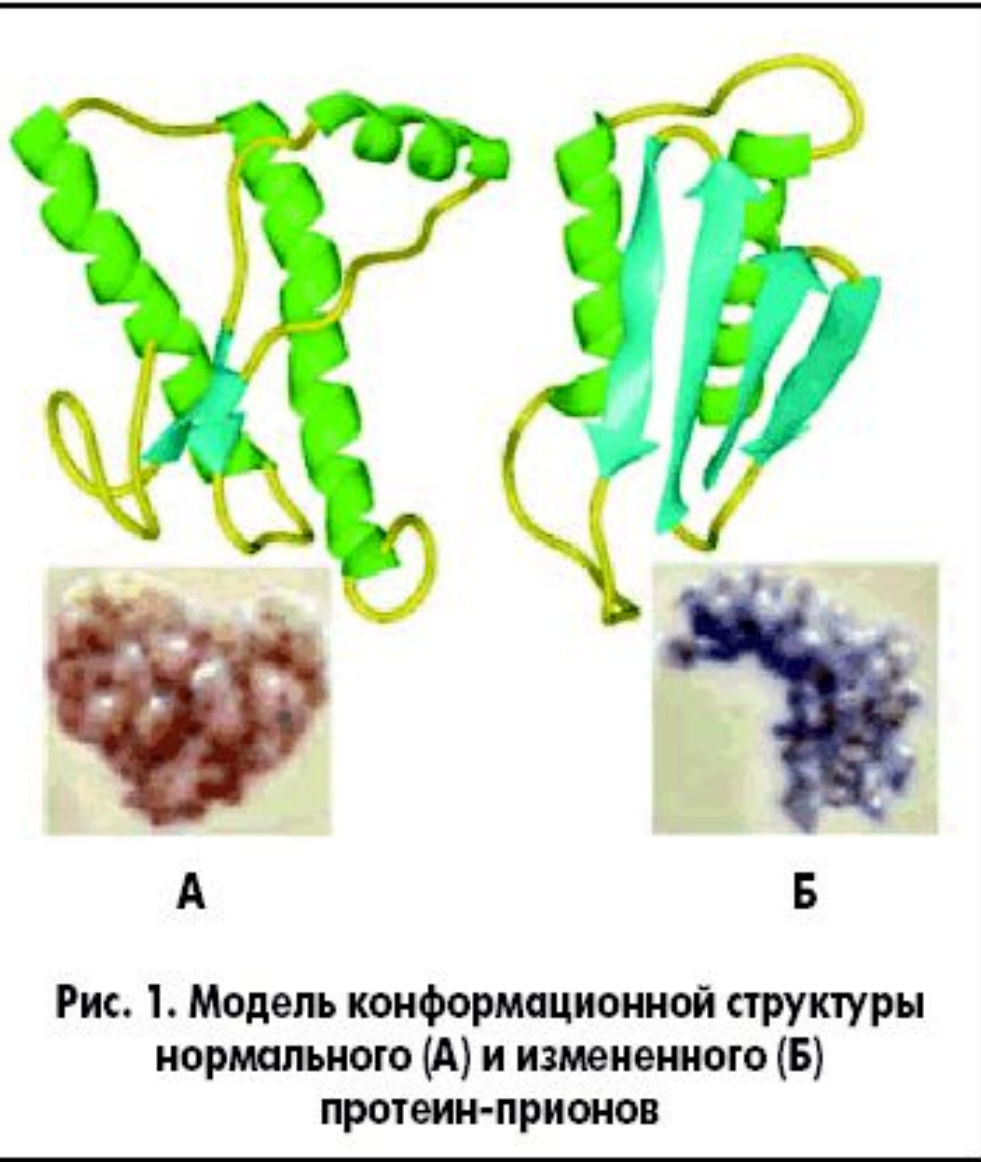
Прионы

Прионный белок может существовать **в двух формах:**

- нормальная клеточная форма (PrP^c) - обнаруживается в организме всех млекопитающих.
- Ген, кодирующий этот белок, расположен **в коротком плече 20 хромосомы.**
- PrP^c участвует в передаче нервных импульсов, в поддержании циркадных ритмов клетки,

Прионы

- инфекционная форма (PrP^s) – характеризуется:
 - измененной вторичной и третичной структурой молекулы,
 - высокой устойчивостью к нагреванию, ультрафиолетовому свету, проникающей радиации и переваривающему действию протеаз.



**Рис. 1. Модель конформационной структуры
нормального (А) и измененного (Б)
протеин-прионов**

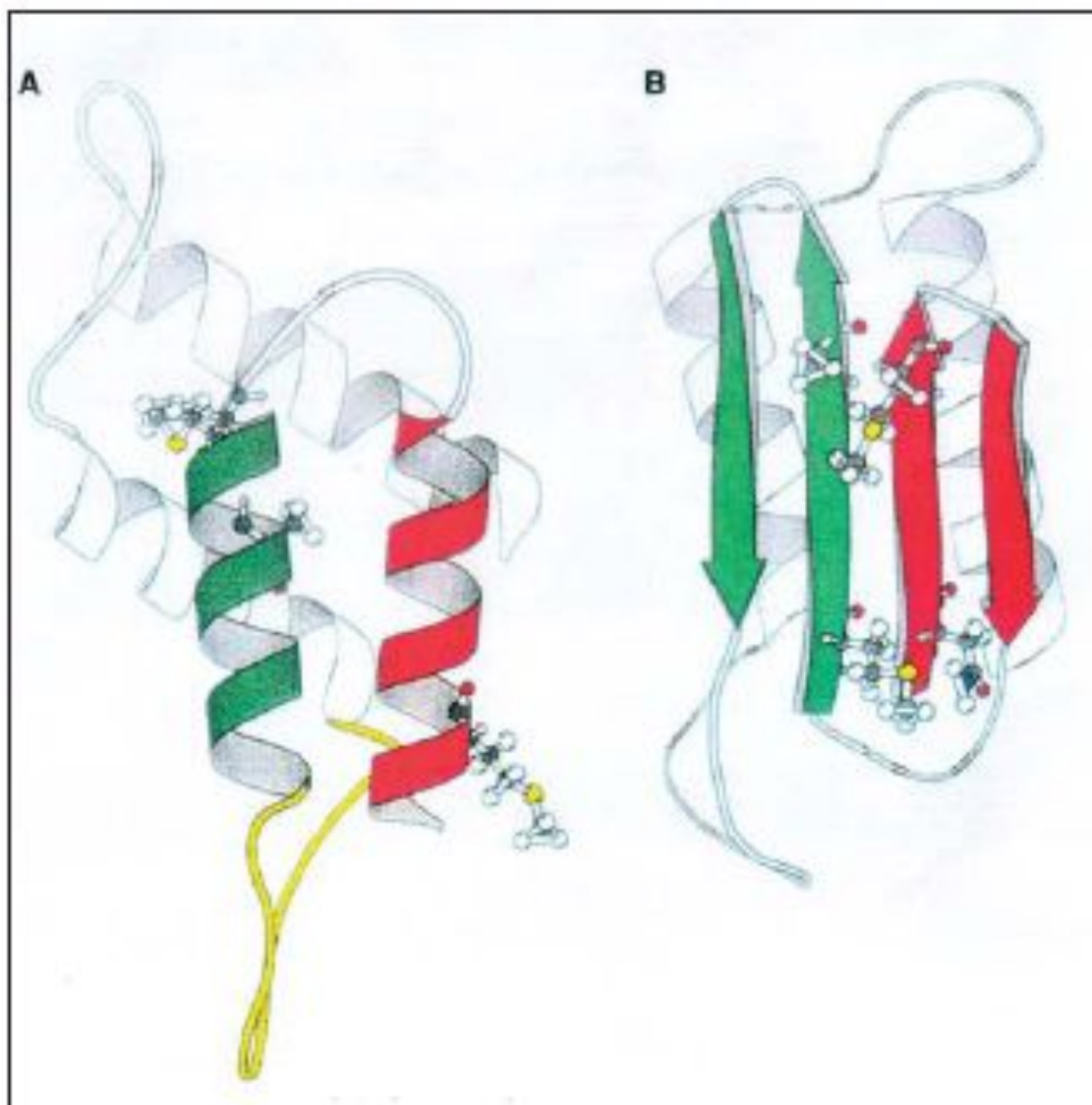
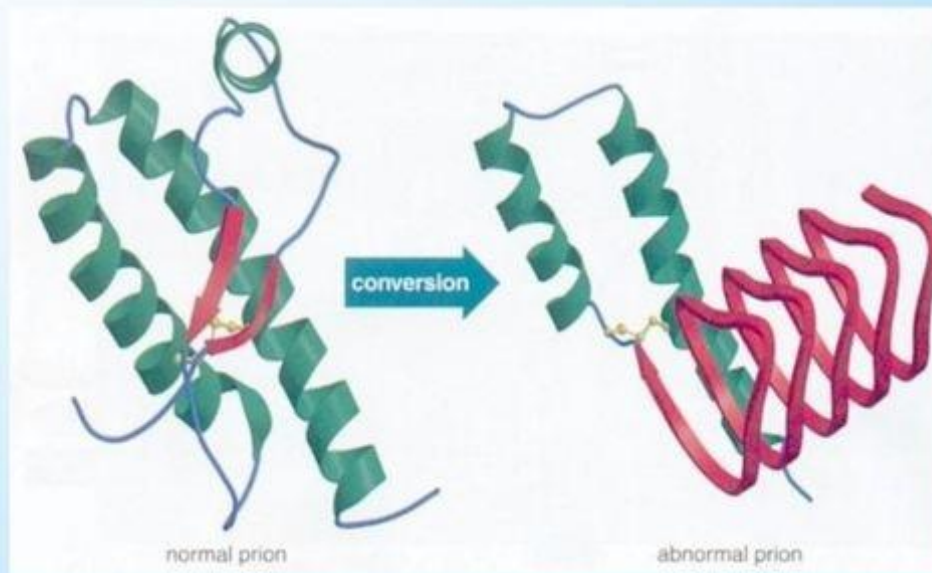


Рис. 2. Схема конформационного изменения клеточного прионного белка

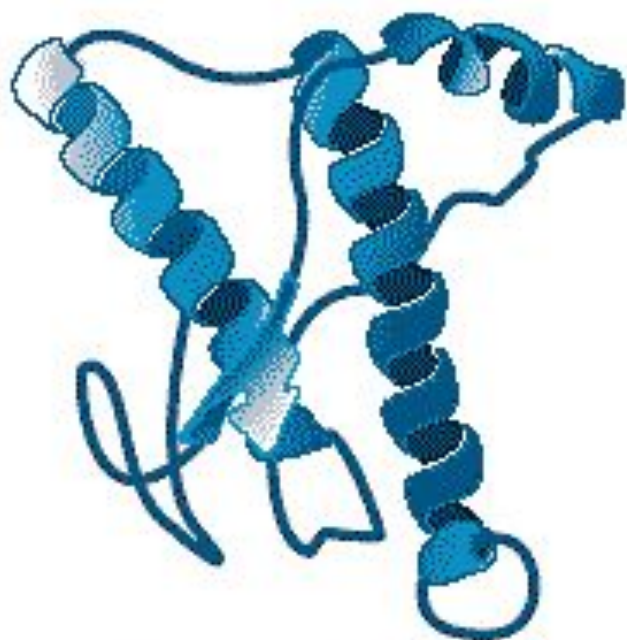
А – молекула клеточного прионного белка PrPC

В – молекула инфекционного прионного белка PrPSc

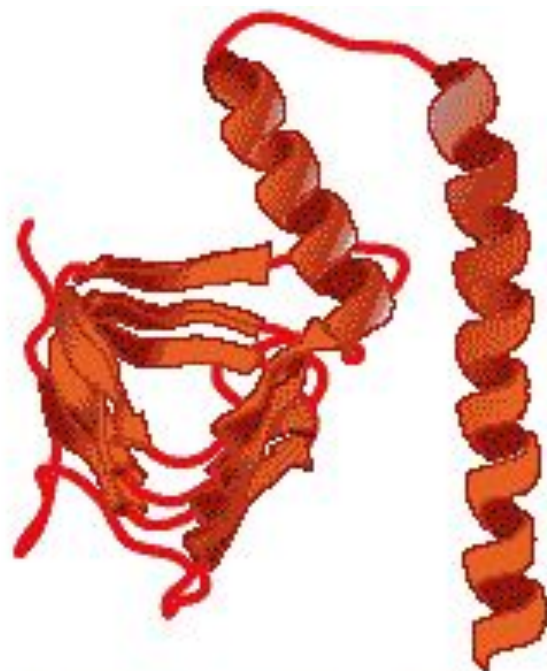
Переход приона из нормальной формы в аномальную



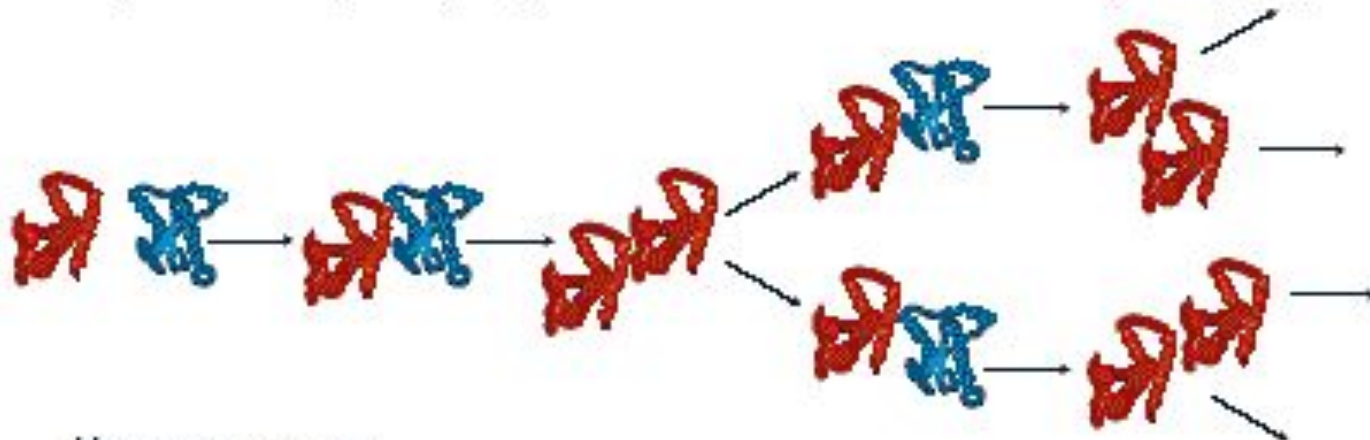
Прионы не структурированы и сильно обогащены аминокислотными остатками глутаматом и аспарагином. Это свойство позволяет прионным доменам полимеризоваться с образованием амилоидных фибрилл



Нормальный прион (PrP^C)

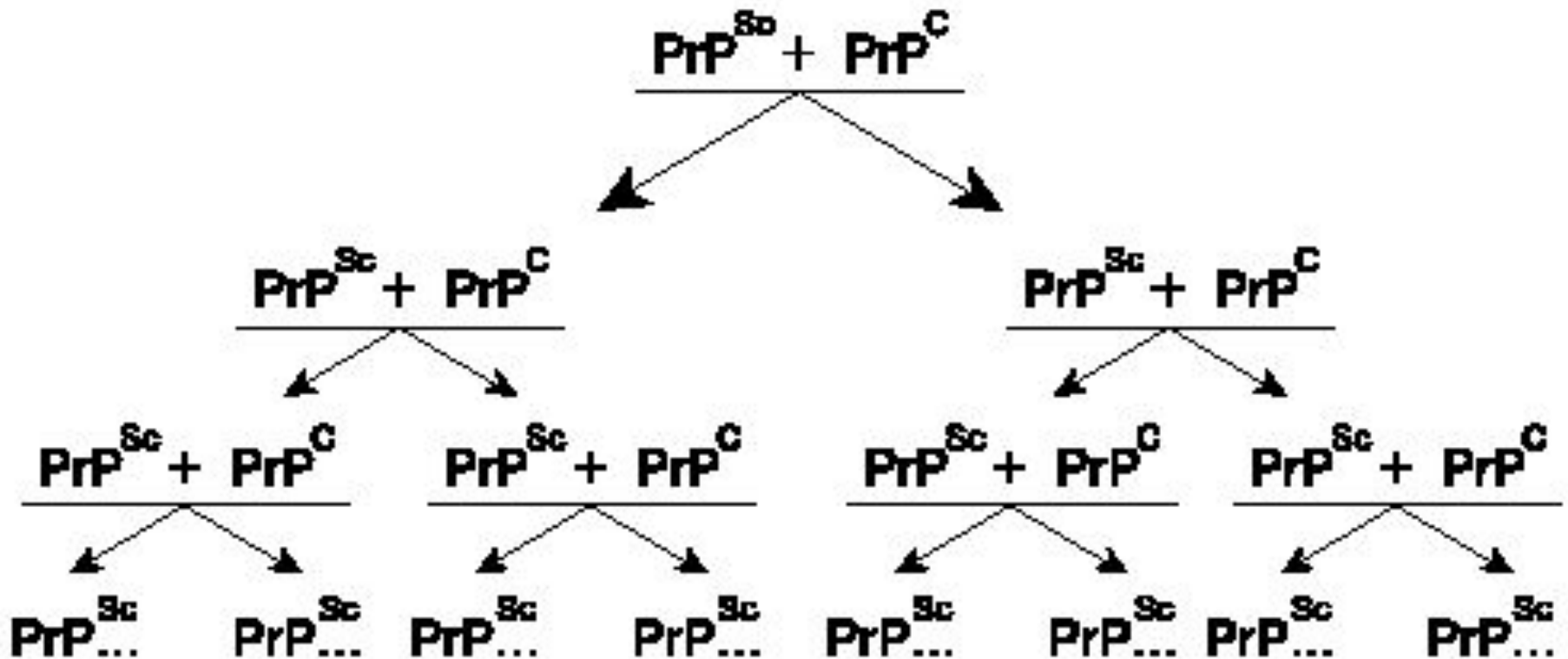


Патогенный прион (PrP^{Sc})



Цепная реакция

Схема «размножения» прионов

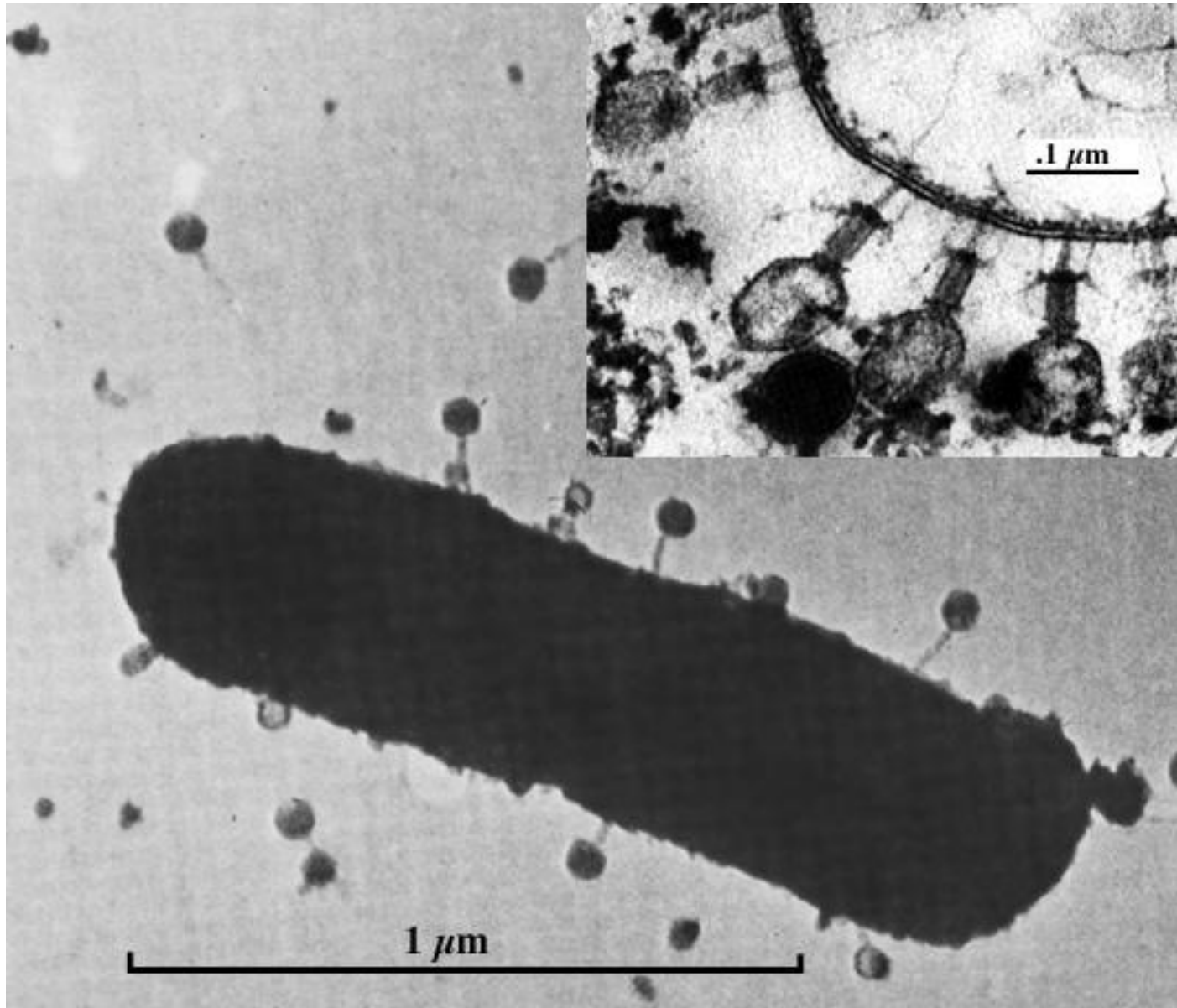


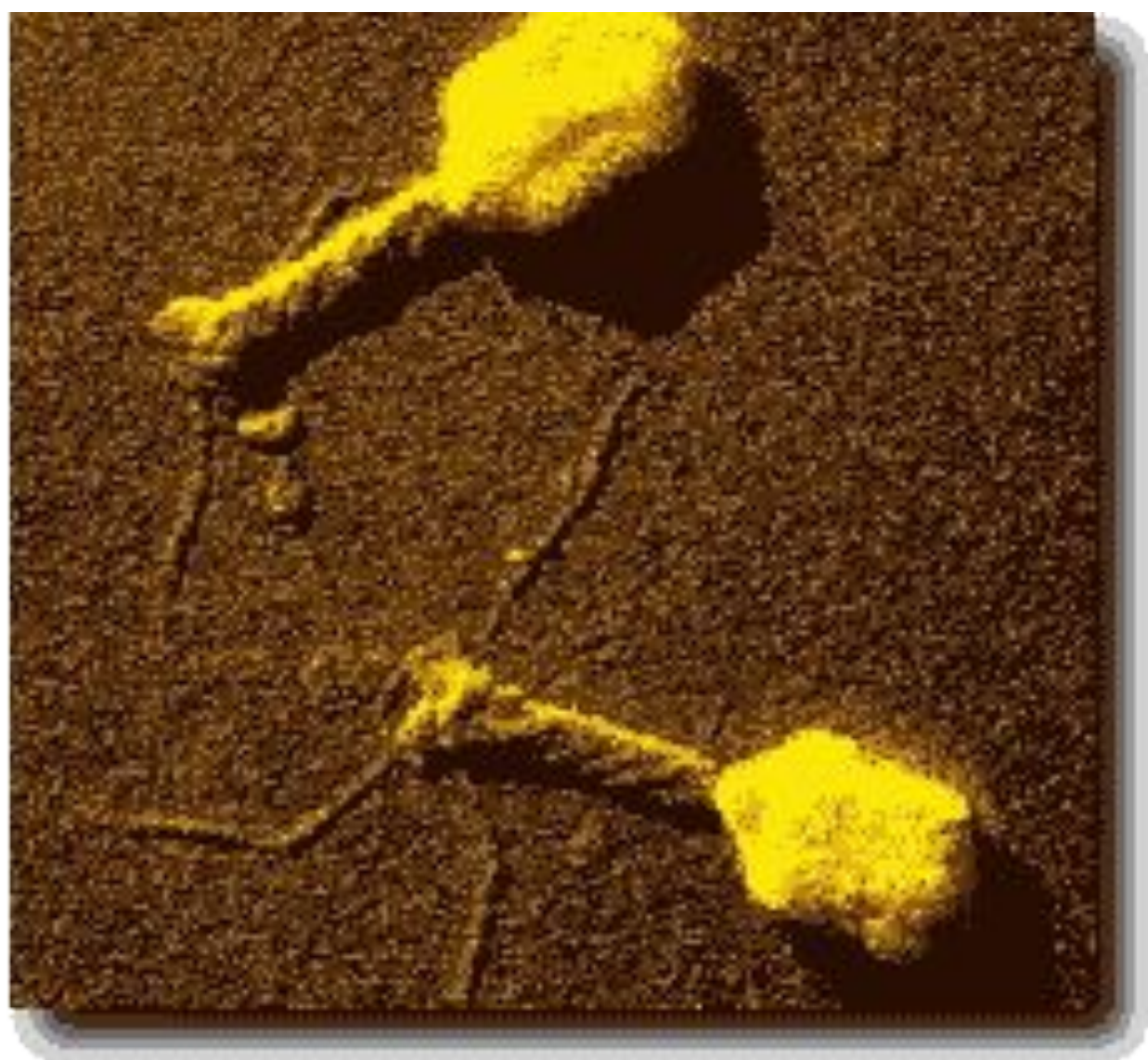
БАКТЕРИОФАГИ

вирусы
бактерий

БАКТЕРИОФАГИ

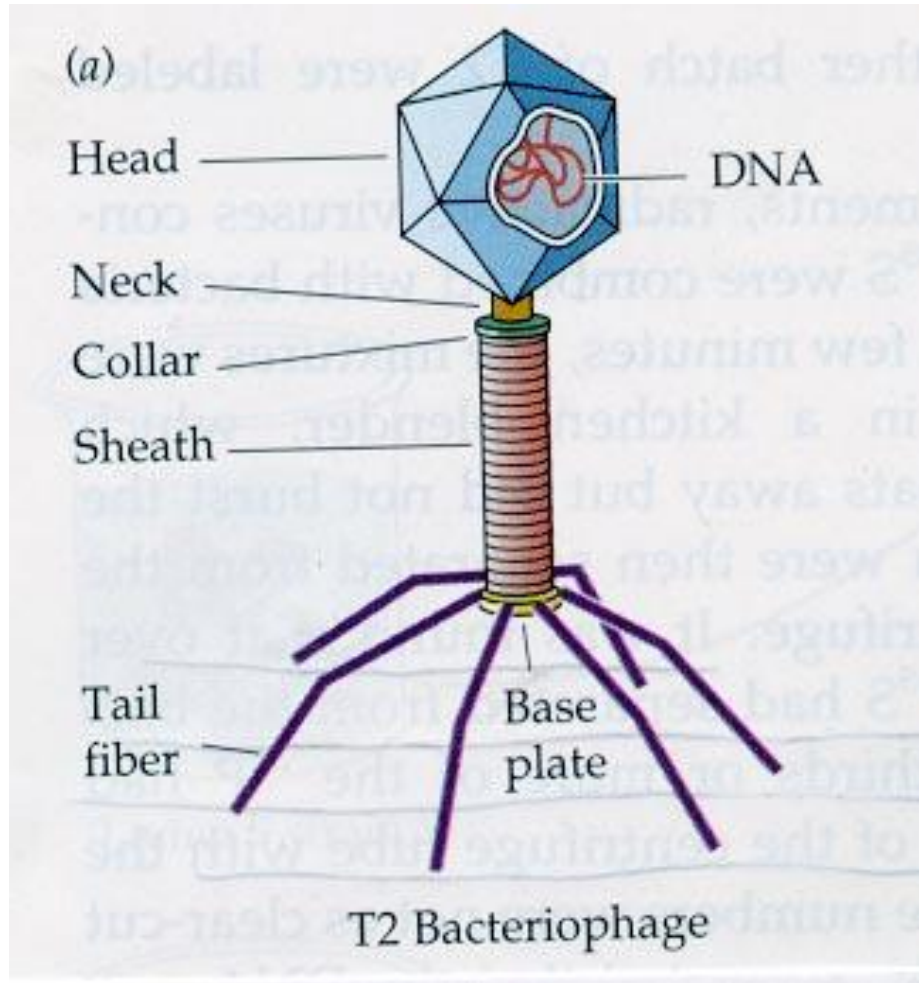
- «пожирающий бактерии» (от бактерия + греч. phagos – пожирающий)
- вирусы бактерий, специфически проникающие в бактериальные клетки и поражающие их.
- **Для обозначения** используют:
 - название м/о, из которых они выделены: колифаги, стафилофаги,
 - буквы латинского алфавита





Строение бактериофагов

- икосаэдрическая головка,
- хвостовой отросток: внутри – полый цилиндрический стержень, сообщающийся с головкой, а снаружи - чехол отростка, заканчивающийся шестиугольной базальной пластинкой с шипами, от которых отходят фибриллы (нити),
- капсид головки и чехол хвостового отростка бактериофага состоят из полипептидных субъединиц, уложенных по **икосаэдрическому (головка)** или *спиральному (отросток)* типу симметрии.



Нуклеиновая кислота фага

- Бактериофаги (фаги) содержат ДНК или РНК:
 - двунитевые
 - однонитевые
 - линейные,
 - -кольцевые.
- Большинство – **двунитевую ДНК, замкнутую в кольцо**

В состав головки входит:

- **полипептид**, состоящий из аспарагиновой, глутаминовой кислот и лизина,
- - у некоторых – **гистоноподобный** белок → суперспирализация ДНК.

В состав сокращающегося чехла ВХОДИТ:

- у некоторых фагов входит АТФ и ионы кальция.
- В дистальной части отростка – лизоцим.

Морфологические типы бактериофагов

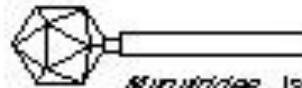
- **I тип (нитчатые)**
 - без головки (только отросток)
- **II тип**
 - без отростка (только головка)
- **III тип**
 - головка и отросток, короткий без чехла
- **IV тип**
 - головка и отросток, длинный с чехлом, не сократительный
- **V тип**
 - головка и отросток, длинный с чехлом, сократительный

Families of Viruses Infecting Bacteria

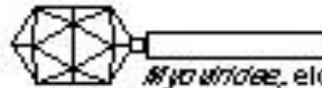
dsDNA



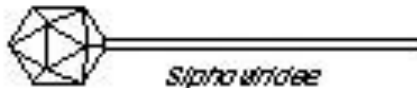
Lipovirginiviridae



Mycoviridae, Isometric head



Mycoviridae, elongated head



Siphoviridae



Podoviridae



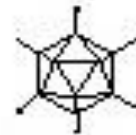
Pleomorphicidae



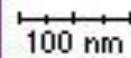
Cubicalidae



Fusiformidae



Tailedidae



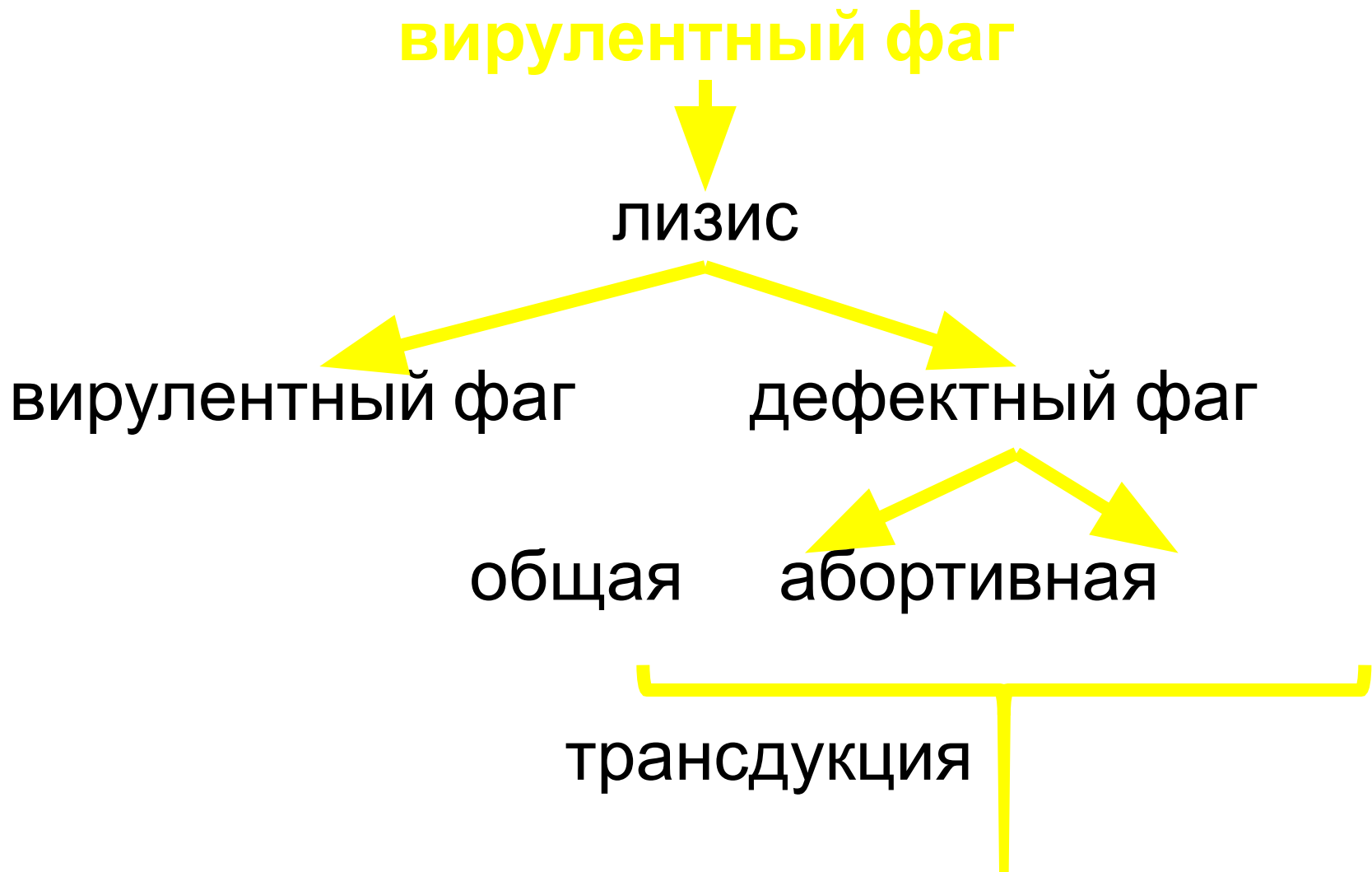
Классификация бактериофагов по спектру действия

- **полифаги**
 - поражают несколько видов
- **монофаги** (видовые)
 - поражают один вид
- **типовые фаги**
 - поражают часть вида (фаговар)

Классификация фагов в зависимости от эффекта действия на бактериальную клетку

- вирулентные
- умеренные

Классификация фагов в зависимости от эффекта действия на бактериальную клетку



Классификация фагов в зависимости от эффекта действия на бактериальную клетку

умеренный фаг

ЛИЗОГЕНИЯ

- без изменения фенотипа бактерии
- с изменением фенотипа бактерии (*фаговая конверсия*)

ЛИЗИС

умеренный

дефектный

специализированная трансдукция

Взаимодействие фагов с бактериями

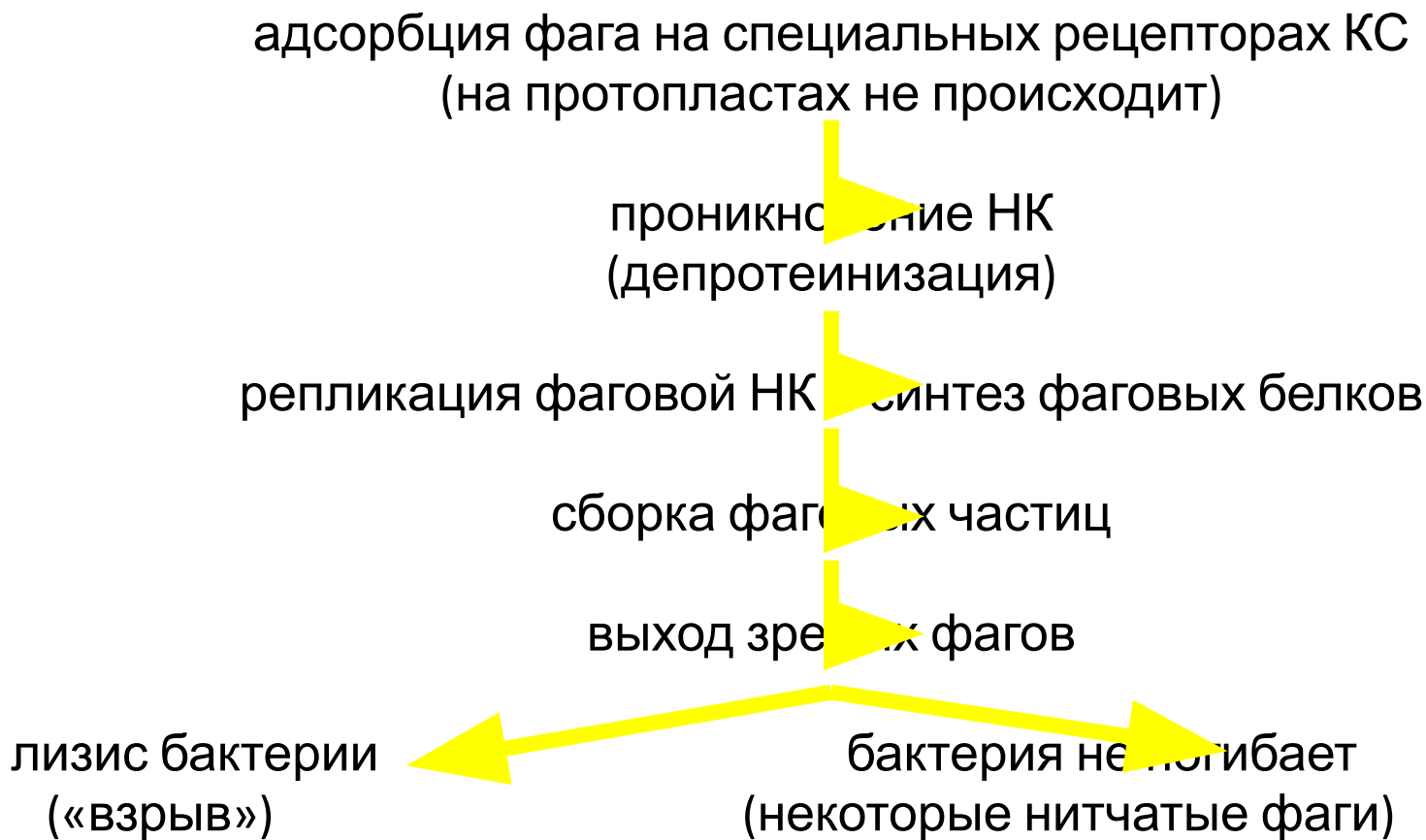
- может происходить:
 - по продуктивному типу – вирулентные фаги → фаговое потомство, бактерии лизируются
 - интегративному – умеренные → встраиваются в геном клетки и сосуществуют с ней,
 - abortивному типу → фаговое потомство не образуется, бактерии сохраняют свою жизнедеятельность



Вирулентные бактериофаги

- попав в бактерию, реплицируются, формируя 200-300 фаговых частиц, и вызывают гибель (лизис) бактерии = это **продуктивный тип взаимодействия**

Взаимодействие вирулентного фага с бактериальной клеткой

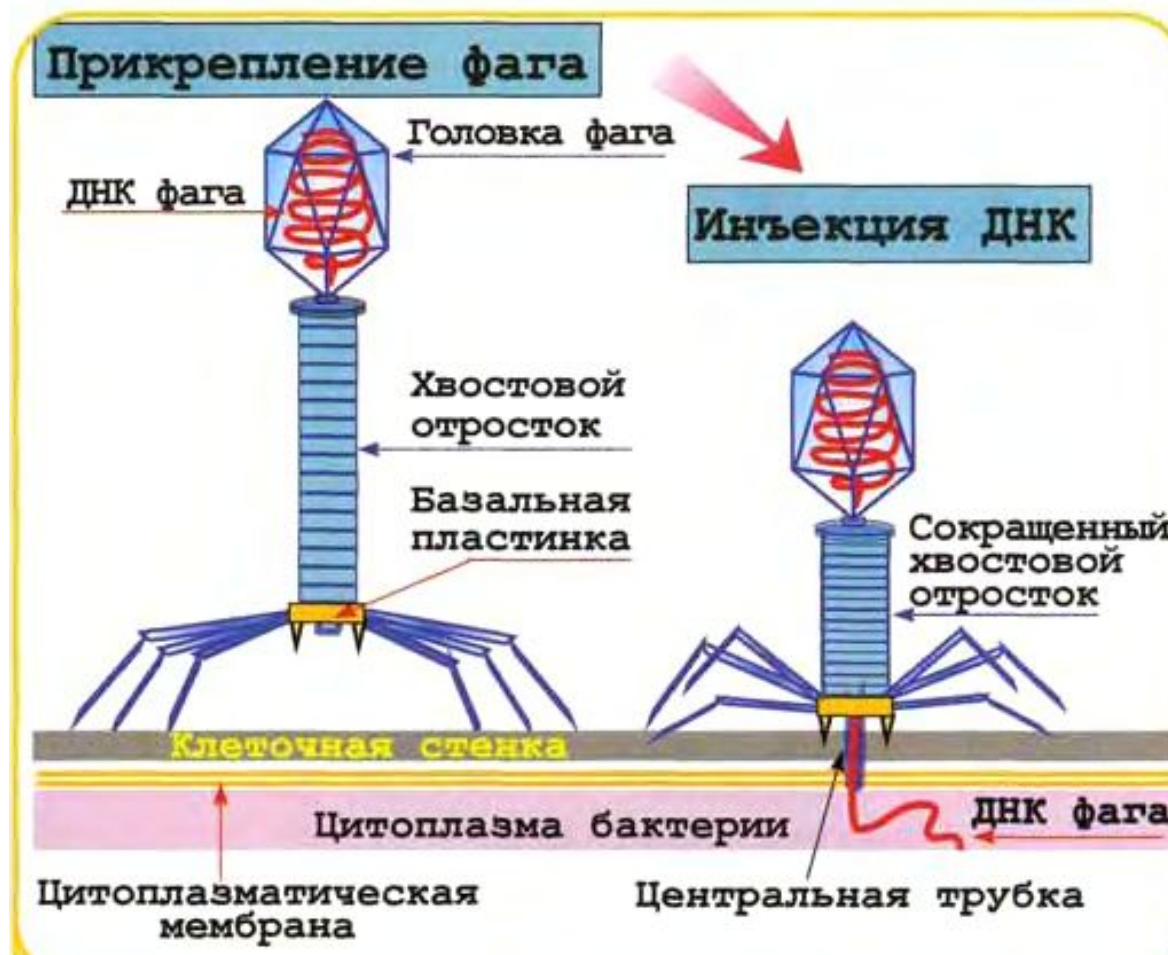


ПРОДУКТИВНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Этапы взаимодействия вирулентного фага с бактериальной клеткой =продуктивный тип взаимодействия

- 1. Бактериофаги с сокращающимся чехлом **адсорбируются на клеточной стенке** с помощью фибрилл хвостового отростка.
- 2. **Чехол хвостового отростка сокращается**, и стержень с помощью ферментов (лизоцима) просверливает оболочку клетки.
- 3. Через канал стержня бактериофага **нуклеиновая кислота инъецируется из головки в бактериальную клетку**, а капсид бактериофага остается снаружи бактерии.

Взаимодействие бактериофага с оболочкой клетки



Этапы взаимодействия вирулентного фага с бактериальной клеткой =продуктивный тип взаимодействия

- 4. Инъецированная внутрь клетки нуклеиновая кислота подавляет биосинтез компонентов клетки, заставляя ее синтезировать нуклеиновую кислоту и белки бактериофага:
 - происходит полный распад ДНК бактерии и ее утилизация.
 - если ДНК бактерии не хватает для образования фаговой ДНК – она синтезируется из компонентов среды.

Этапы взаимодействия вирулентного фага с бактериальной клеткой =продуктивный тип взаимодействия

- 5. Образовавшиеся в разных частях клетки **компоненты бактериофага собираются в фаговые частицы** путем заполнения фаговой нуклеиновой кислотой пустотелых капсидов головки
- 6. Сформированная **головка соединяется с хвостовой частью**, образуя новый фаг.
- Затем в результате лизиса клетки бактериофаги выходят из нее.

Взаимодействие умеренного фага с бактериальной клеткой

адсорбция фага на специальных рецепторах КС
(на протопластах не происходит)

проникновение НК
(депротеинизация)

интеграция фаговой ДНК в геном бактерии

профазия
(фаговый репрессор блокирует транскрипцию)

лизогенная культура
ЛИЗОГЕНИЗАЦИЯ
в дальнейшем – может
индукция профага

продуктивная инфекция

Взаимодействие умеренного фага с бактериальной клеткой

- ***Умеренные бактериофаги*** взаимодействуют с бактериями:
 - либо по продуктивному,
 - либо по интегративному типу.
- **Продуктивный цикл умеренного фага** идет как и у вирулентных фагов, и заканчивается лизисом бактерий.

Взаимодействие умеренного фага с бактериальной клеткой

- **При интегративном типе ДНК** умеренного фага **встраивается в хромосому** бактерии:
 - приобретает форму кольца,
 - интегрируется в гомологичную область,
 - реплицируется синхронно с геномом бактерии, не вызывая ее лизиса (передается при делении бактерии).

Взаимодействие умеренного фага с бактериальной клеткой

- ДНК фага, встроенная в хромосому бактерии, называется **профагом**,
 - культура бактерий — **лизогенной**;
 - сам процесс — **лизогенией**
- (от греч. *lysis* – разложение, *genea* – происхождение).

Взаимодействие умеренного фага с бактериальной клеткой

- **При лизогении** фаги не образуются в результате “выключения” фаговых генов репрессором (=низкомолекулярный белок), кодируемым одним геном фага.
- **Профаги** могут спонтанно или под действием *индуцирующих* агентов (УФ-лучи, митомицин С и др.) дерепрессироваться, исключаться из хромосомы. Этот процесс заканчивается продукцией фагов (*индукция* профага) и лизисом бактерий.

Взаимодействие умеренного фага с бактериальной клеткой

- Профаг придает бактерии новые свойства, что получило название фаговой конверсии (лат. *conversio* – превращение).
- **Конвертироваться** могут:
 - морфологические,
 - культуральные,
 - биохимические,
 - антигенные и другие свойства бактерий.
- Например, наличие профага в дифтерийной палочке обуславливает ее способность продуцировать дифтерийный экзотоксин.

Применение фагов

- для профилактики,
- для лечения инфекций,
- в генной инженерии в качестве векторов для получения рекомбинантной ДНК,
- для диагностики (например, для фаготипирования с целью выявления источника инфекции или внутривидовой идентификации).

Практическое применение бактериофагов

Фагопрофилактика

- брюшной тиф
- дизентерия

Практическое применение бактериофагов

Фаготерапия

Фаг применяется в том случае, когда
антибиотики применять нельзя,

Чаще всего местно

Практическое применение бактериофагов

Фагодиагностика

1. **Выявление определённого вида бактерий в патологическом материале**
 - реакция нарастания титра фага
2. **Идентификация чистой культуры**
 - определение вида
 - фагоиндикация
 - определение фаговара
 - фаготипирование

Выделение бактериофага

материал

- объект внешней среды
- бактериальная культура



бактериальный фильтр



фильтрат



МПБ + чувствительная бактерия



Инкубация 24 час



роста нет – фаг присутствует (очищают фильтрованием)
рост есть – фаг отсутствует

Определение активности бактериофагов = фагоиндикация

–Качественный метод:

метод «стерильной дорожки»

–Количественные методы:

- А) Метод Грациа
- Б) Метод Аппельмана

Определение активности бактериофагов = фагоиндикация

– Качественный метод:

На чашку газоном засевают культуру микроорганизмов, наносят каплю бактериофага и дают ей стечь. Чашки инкубируют при 37 градусах 24 час и учитывают результат:

- *там, где стекал бактериофаг, образовалась «стерильная дорожка»*

Метод фагоиндикации = «стекающая капля» = «стерильная дорожка»

стекающая капля по газону
засеянной культуры

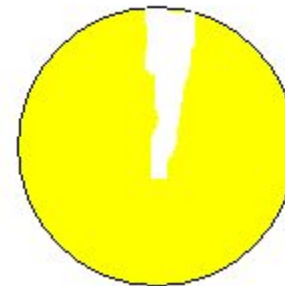
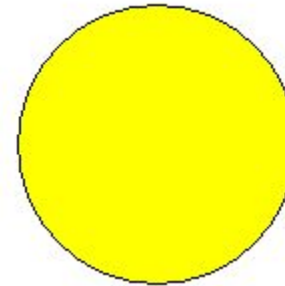


регистрация роста
бактерий в месте
стекания капли



рост есть – -
роста нет – +

«стерильная дорожка»



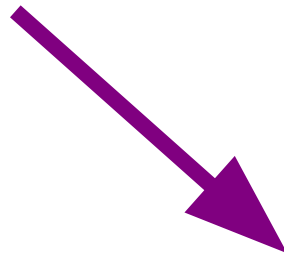
Определение активности бактериофагов = фагоиндикация

–Количественные методы:

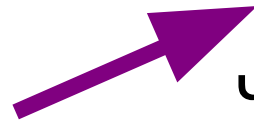
- А) **Метод Грациа**: готовят десятикратные разведения фага в хлориде натрия от 10^{-2} до 10^{-7}
- Затем по 0,5 мл из каждого разведения смешивают с таким же объемом бульонной культуры и 4 мл расплавленного и остуженного до 45 град. агара и выливают на чашки Петри.
- Когда агар застынет чашки помещают в термостат при 37 градусах на 24 часа и затем учитывают результаты:
 - одна фаговая частица образует одно «стерильное пятно»
 - Величина, показывающая концентрацию фага

Титрование фага по Грациа

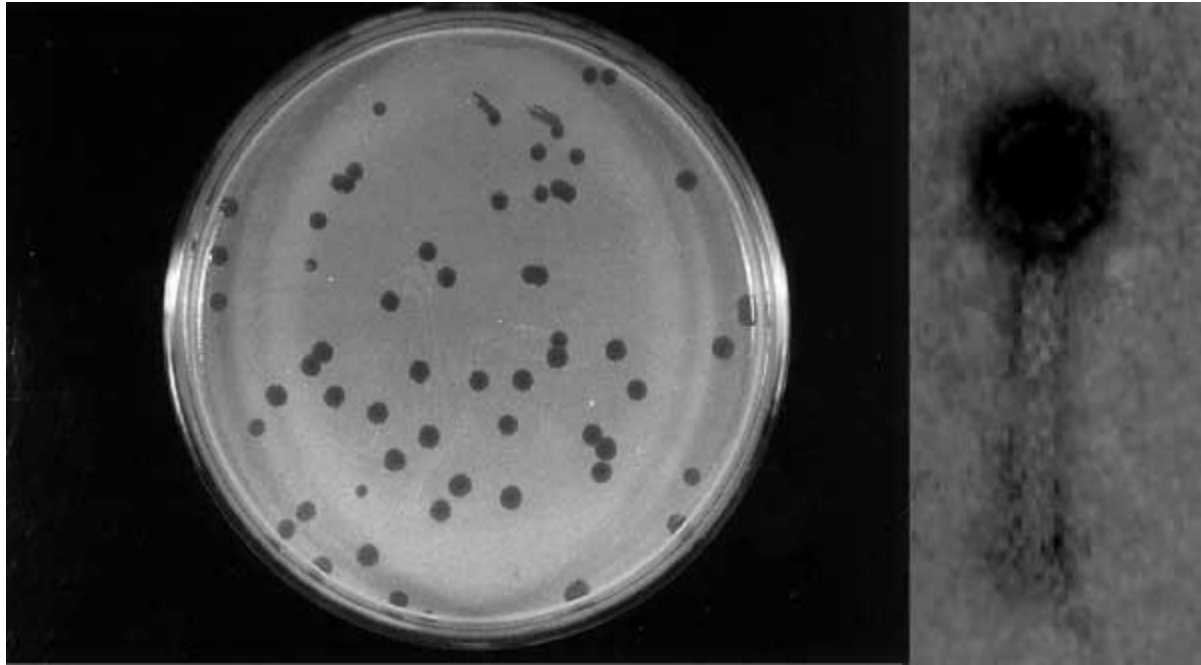
- МПА + разведение фагосодержащего материала + чувствительная культура



- МПА (подложка)



чашка Петри со средой
(в разрезе)



Определение активности бактериофагов = фагоиндикация

–Количественные методы:

Б) **Метод Аппельмана**: готовят десятикратные разведения фага в питательном бульоне от 10^{-2} до 10^{-8} .

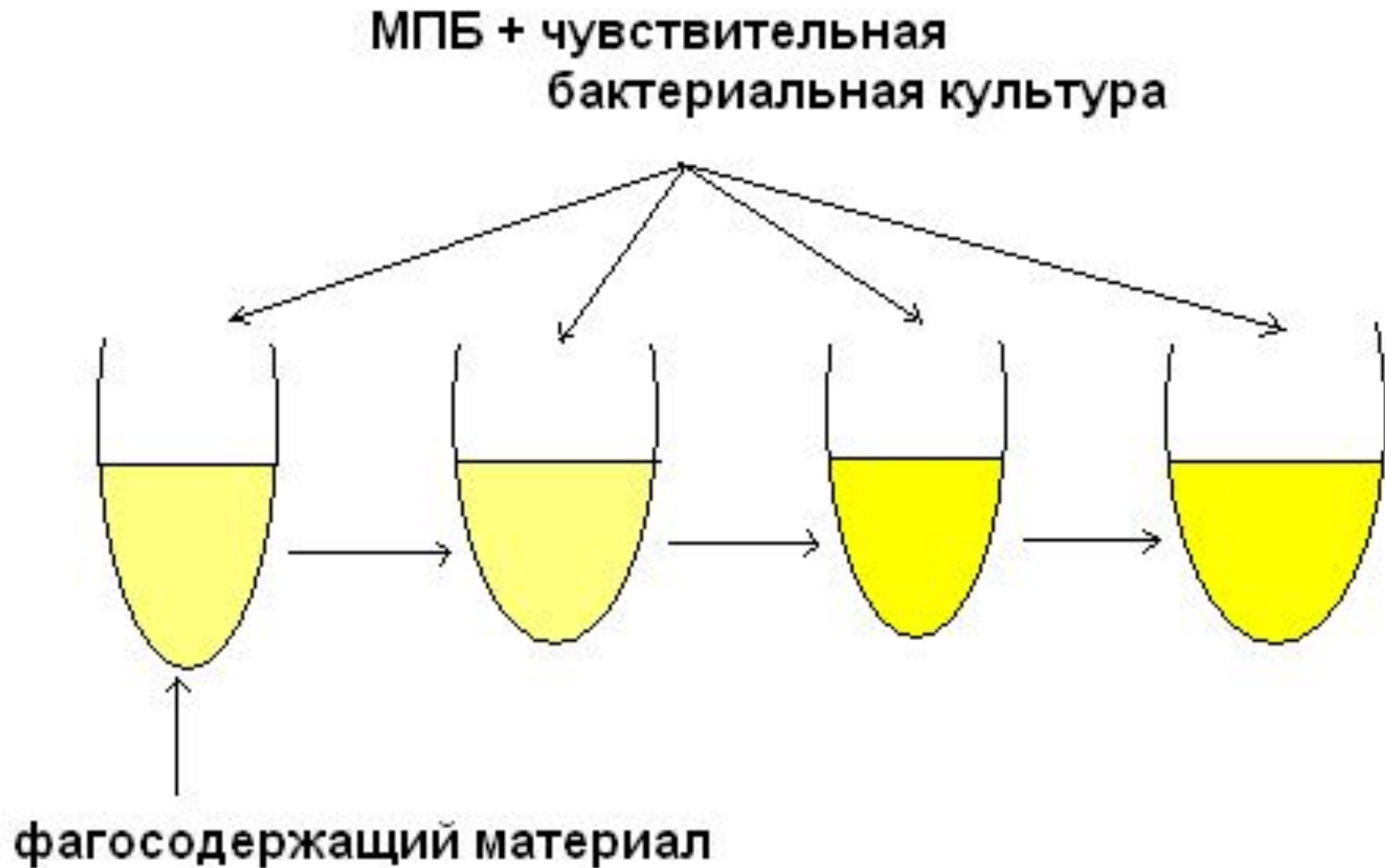
- Затем в каждую пробирку добавляют по 0,2мл бульонной культуры и ряды ставят в термостат.

- После инкубации в термостате учитывают результаты:

= в положительном случае наблюдается просветление среды.

*Разведение в последней пробирке, где произошел полный лизис культуры, называется **титром***

Титрование фага по Аппельману

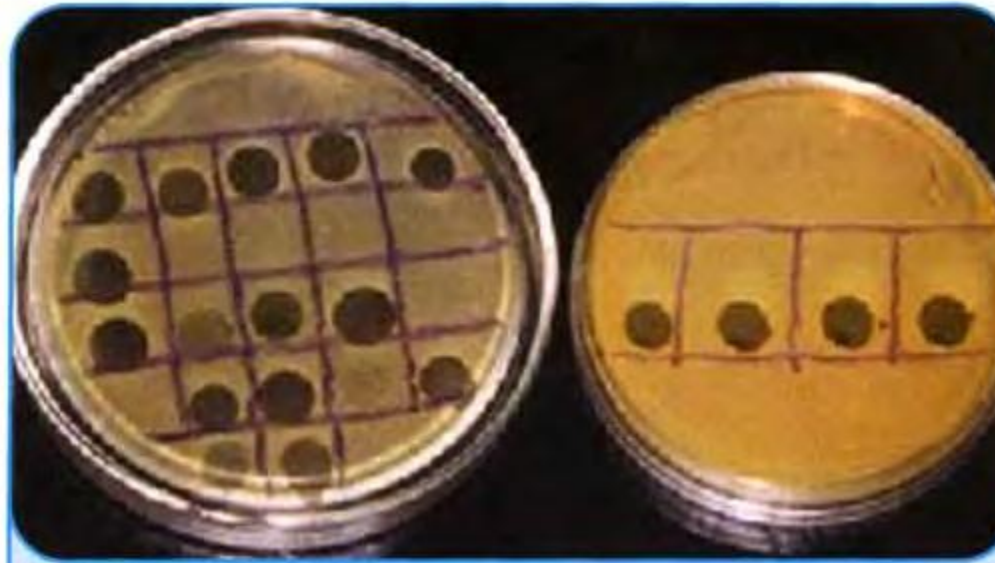


Фаготипирование бактерий

1. засев газоном на чашку с питательным агаром изучаемого штамма
2. чашку делят на квадратики и на каждый наносят бактериофаг
3. инкубация
4. регистрация «стерильных пятен» («бляшек»)
5. фаготип (фаговар) = перечень типовых фагов, лизирующих данный вариант



Фаготипирование стафилококков



Определение спектра литического действия фага

- Чашку делят на квадратики и на каждый газоном засевают испытуемые штаммы,
- затем на каждый квадратик петлей или пипеткой наносят каплю фага
- после инкубации в термостате в течение 24 час определяют наличие «стерильных пятен».
- *Количество культур, которые лизирует бактериофаг – спектр его литического действия.*

