



**МОРФОЛОГИЯ, СТРУКТУРА,
ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ВИРУСОВ, ИХ
КЛАССИФИКАЦИЯ. ОСОБЕННОСТИ
ПАТОГЕНЕЗА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ,
ПРОТИВОВИРУСНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ**

Лектор: ассистент кафедры
микробиологии, вирусологии и
иммунологии ,
к.б.н. Топол Инна Александровна

- ▣ **Вирус** (от лат. virus — **яд**) — микроскопическая частица, состоящая из белков и нуклеиновых кислот и способная инфицировать клетки живых организмов.
- ▣ Все вирусы существуют в двух качественно разных формах: внеклеточной - **вирион** и внутриклеточной - **вирус**.



Исторический очерк

I период (древнейший мир - 1892). Вирусология как наука не существовала, а все исследования носили эмпирический характер. В это время Л. Пастер занимается бешенством. Создав первую вакцину против вирусного заболевания, он, однако, не раскрыл сущности вирусов.

В последующем английским врачом Э. Дженнером предложена вакцина против оспы людей как метода иммунизации людей против этого заболевания.

Открытие вирусов (II период).

Впервые существование вируса доказал в 1892 году Д.И. Ивановский. На заседании Российской академии наук он сообщил, что возбудителем мозаичной болезни табака является фильтрующийся вирус. Эту дату можно считать днем рождения вирусологии, а Д.И. Ивановского - ее основоположником.



Д. И. Ивановский
(1863 – 1920)

Вирус табачной мозаики



Лист табака, пораженный
болезнью



Нить РНК окружают
«кирпичики» белка

Исторический очерк (III период)

- ▣ В **1930**-е гг. – изучены все лейкозные вирусы.
 - ▣ В **1933** году был открыт вирус гриппа А,
в **1934** году – вирус гриппа В.
 - ▣ В конце **40**-х годов был разработан метод культивирования вирусов в клеточных культурах.
- В **1952** году Эндерс, Уэллер и Роббинс были удостоены Нобелевской премии за разработку методов культивирования вирусов.

Это позволило:

- ▣ выделять новые вирусы,
- ▣ их идентифицировать,
- ▣ изучать их взаимодействие с клеткой



Исторический очерк

Дж.Солк и Сейбин (США) разработали технологию производства вакцин – сначала убитой, а затем живой аттенуированной.

Вакцина против полиомиелита стала первой культуральной вакциной.

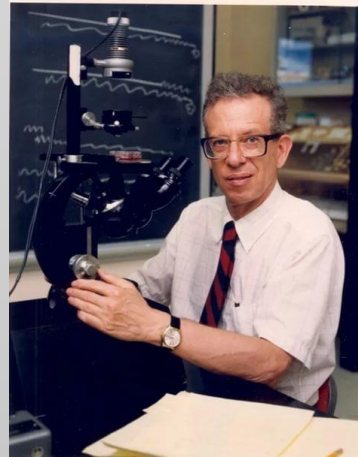
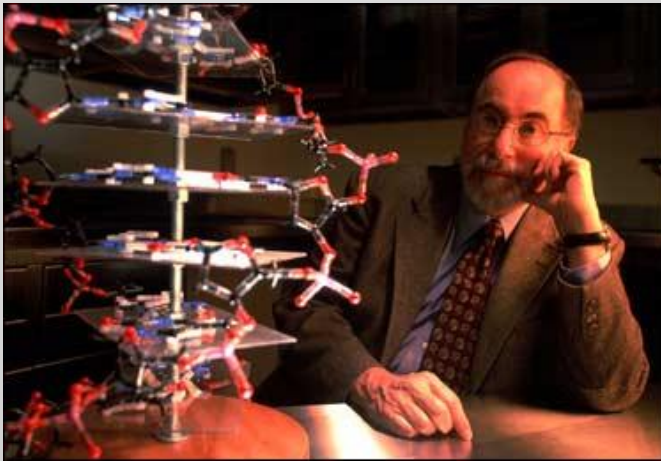
■ В **50-х** годах наши исследователи Чумаков и Смородинцев приняли участие в разработке вакцины против полиомиелита, которая проводилась в рамках международного сотрудничества в области медицины.

■ В результате в **1959** году была проведена массовая иммунизация детей в нашей стране.



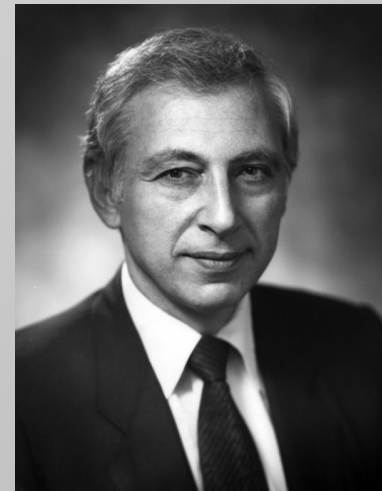
Исторический очерк (IV период)

- В **1979** году Балтимор и одновременно Темин (США) открыли обратную транскриптазу в составе РНК-содержащих онкогенных вирусов.
- Это фермент, с помощью которого РНК переписывается на ДНК (РНК-зависимая ДНК-полимераза); появилась возможность получения ДНК-копии на матрице вирусной РНК.
- В **1972** году П. Бэрг (США) получил рекомбинантные молекулы ДНК – так началась эра генной инженерии.



Исторический очерк

- ▣ **Бламберг (Blumberg)**, Нобелевский лауреат **(1972)** исследовал антигены крови аборигенов Австралии. Он предположил, что открыл новый антиген крови. Но позже, при медицинском обследовании пациентов, было установлено, что они больны гепатитом, а этот антиген – **HbsAg** -поверхностный антиген вируса гепатита В.
- ▣ В **1982-1983** г.г. Монтанье (Франция), а затем и Р. Галло (США) выделили вирус иммунодефицита человека (предварительно были изучены несколько лимфотропных ретровирусов). Вирус получил название **HIV** (ВИЧ). В **2007** году Монтанье был удостоен Нобелевской премии.



Основные свойства вирусов

- ▣ 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).
- ▣ 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 энергетической, ферментативной и белок-синтезирующей систем, в связи с чем вирусы являются абсолютными (облигатными) внутриклеточными паразитами.
- ▣ 6. Разобщённый (дисъюнктивный) способ размножения (репликации): происходит сборка компонентов вируса (нуклеиновая кислота+белок)
- ▣ 7. Средой обитания вирусов являются живые клетки - бактерии (это вирусы бактерий, или *бактериофаги*), клетки растений, животных и человека.

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).

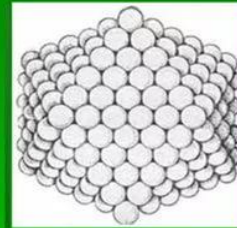
2. **Капсид** - белковая оболочка, в которую упакована геномная нуклеиновая кислота. Капсид состоит из идентичных белковых субъединиц - **капсомеров**.

Существуют три способа упаковки капсомеров в капсид - **спиральный** (спиральные вирусы), **кубический** (сферические вирусы) и **комбинированный** (бактериофаг).

При **спиральной симметрии** белковые субъединицы располагаются по спирали, а между ними, также по спирали, уложена геномная нуклеиновая кислота (нитевидные вирусы).

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

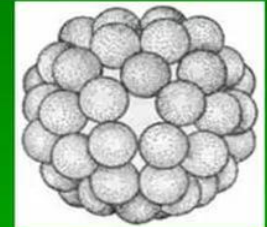
Виды вирусов с кубическим типом симметрии



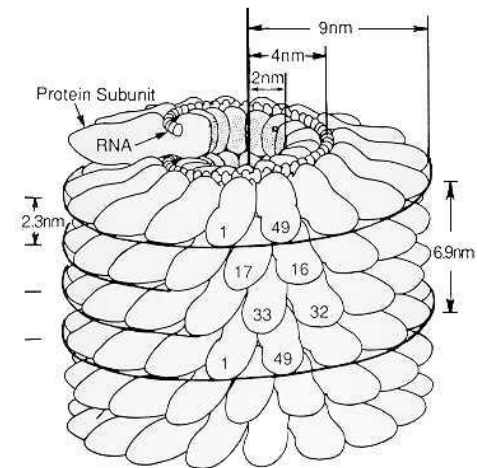
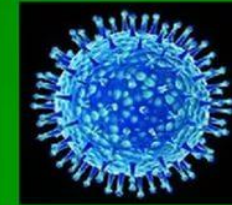
аденовирус



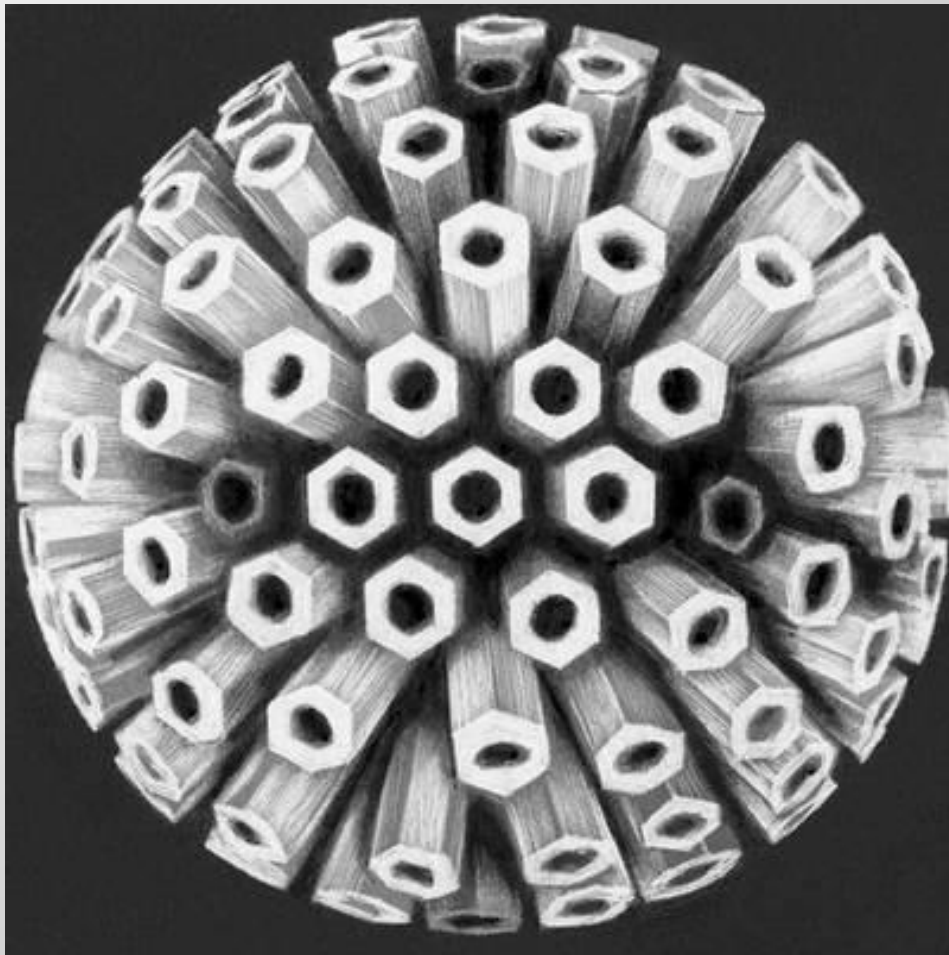
герпес



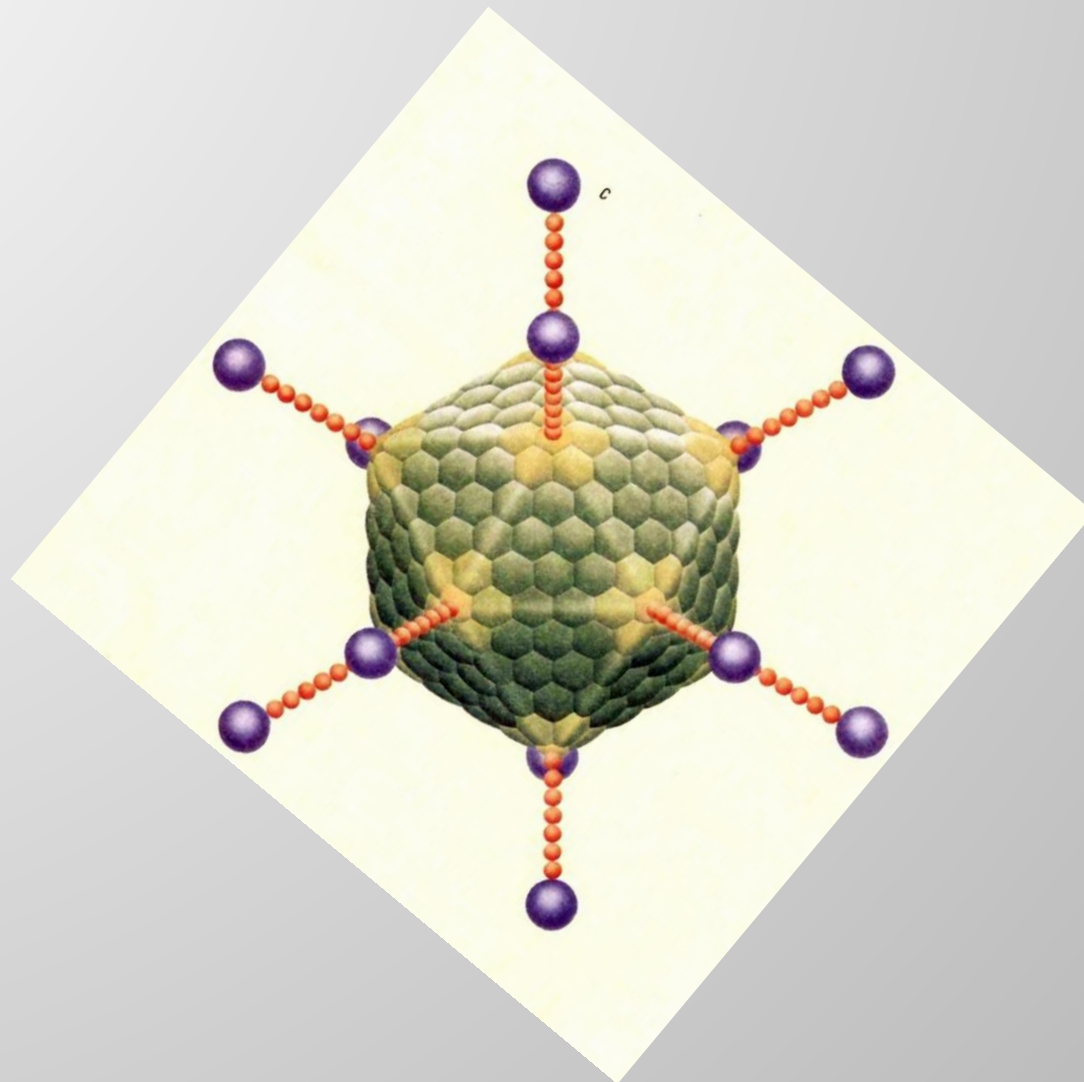
полиомиелит



Герпесвирус



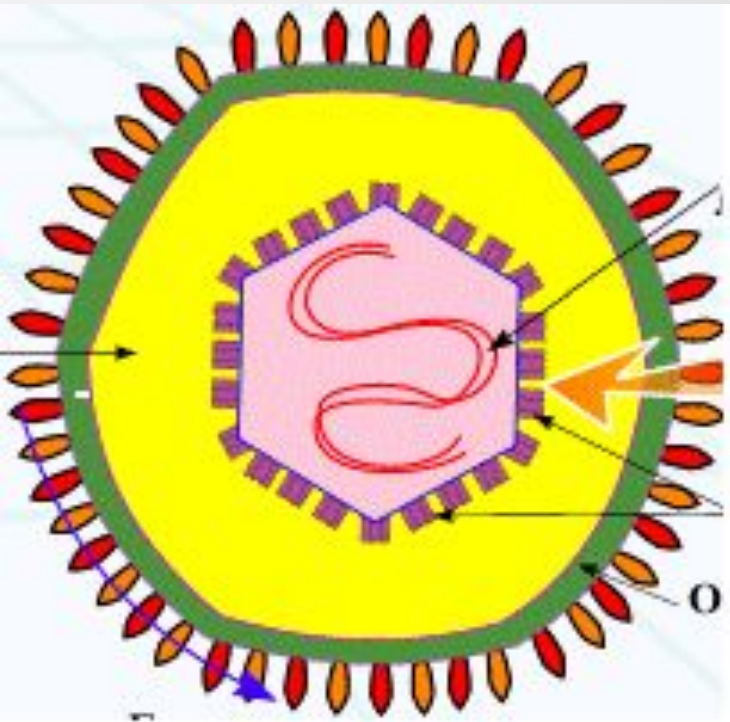
Аденовирус



Вирус табачной мозаики



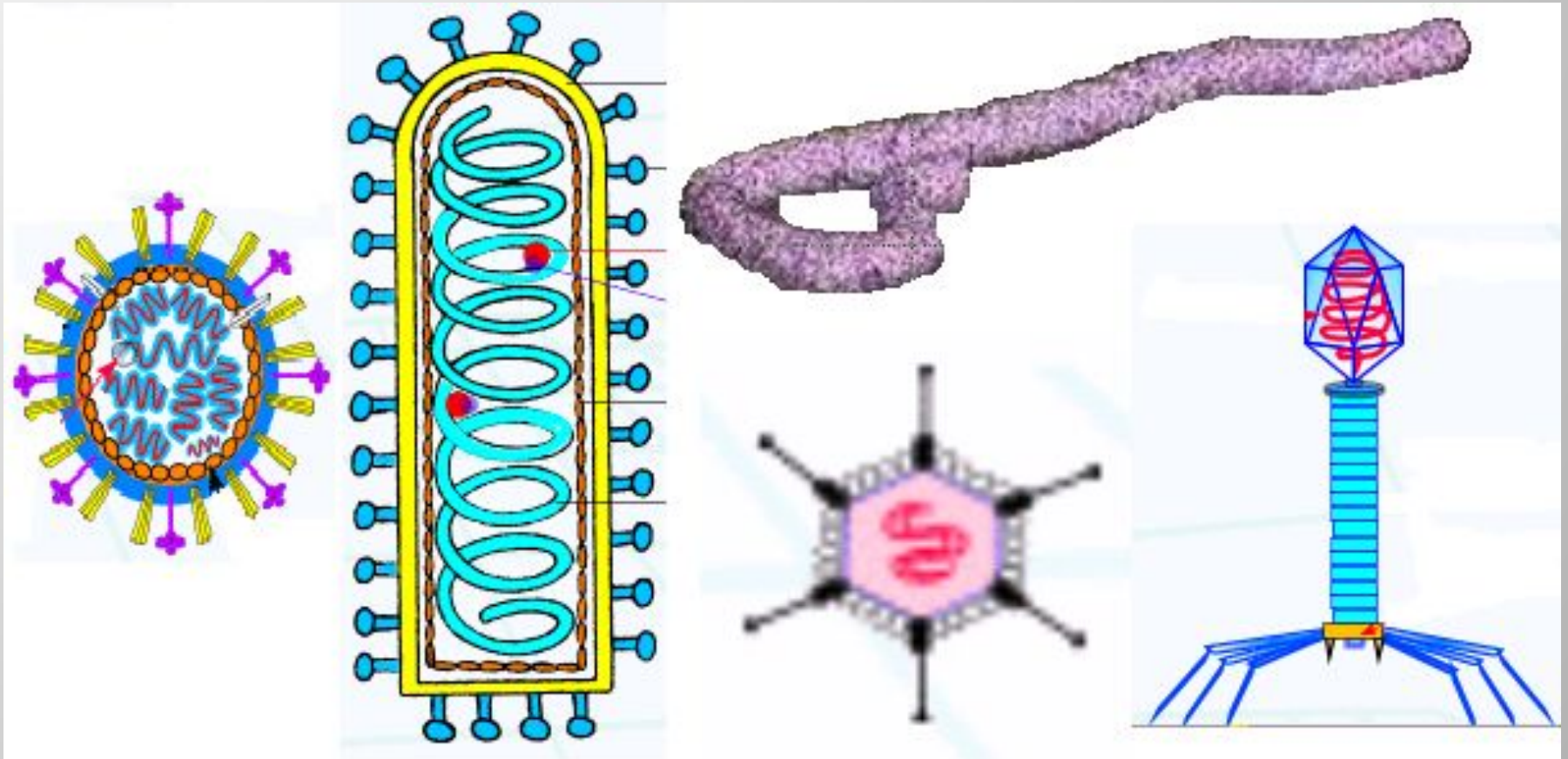
Комбинированный тип симметрии



- ▣ Вирусы с комбинированным типом симметрии имеют нуклеокапсид, характеризующийся кубической симметрией, а расположенный внутри нуклеопротеид уложен спирально

ФОРМА ВИРУСОВ

- шаровидная (бешенство), (грипп), палочковидная (филовирусы), нитевидная (оспа) и сперматозоидная (бактериофаг).

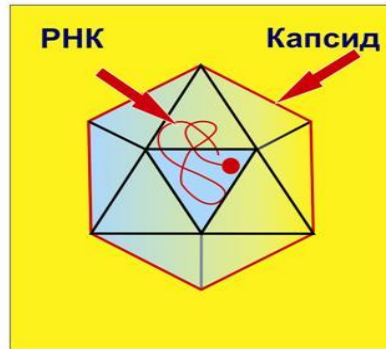


Структура вириона: простые и сложные вирусы

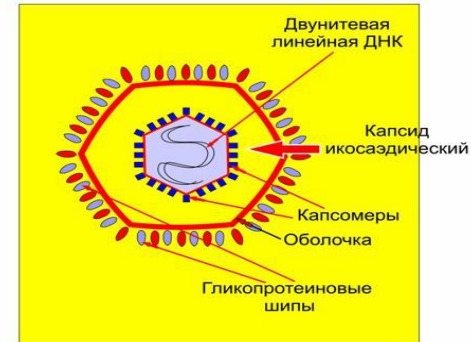
Простой вирус состоит из нуклеиновой кислоты, покрытой защитной белковой оболочкой – капсидом.

Если вирусы имеют липидную оболочку поверх капсида (суперкапсид), такие вирусы называют сложными.

Просто устроенные вирусы
(без оболочки)



Сложно устроенные вирусы
(с оболочкой)



Выделяют 2 группы вирусных белков:

1 - структурные и 2 – неструктурные (функциональные)

Структурные белки:

- белки капсида, отдельные структурные фрагменты – **капсомеры**;
- белки суперкапсида (наружная вирусная оболочка). Эти белки называют **пепломерами** (perlos- покров, мантия). Суперкапсид включает также липиды, фосфолипиды, холестерин, углеводы в составе гликопротеидов

Этапы взаимодействия вируса с клеткой

- Фаза инфицирования включает:
 - **1. Адсорбция** (прикрепление вируса к рецептору клетки). Клеточные рецепторы находятся на дне ямок (углублений), покрытых со стороны цитоплазмы высокомолекулярным белком **клатрином**. Прикрепление вируса – это сигнал для эндоцитоза (ямка превращается в вакуоль и образуется рецептосома).
Эндоцитоз.
 - **2. Слияние мембран** (слияние вирусной оболочки с мембраной вакуоли, в результате белки вируса становятся частью клеточной мембраны. Белок слияния **F (fusion)** обеспечивает трансмембранный переход, а также образование синцития и симпластов.

Способы проникновения вирусов в клетки

1. Виропексис (рецепторный эндоцитоз)

2. Слияние мембран

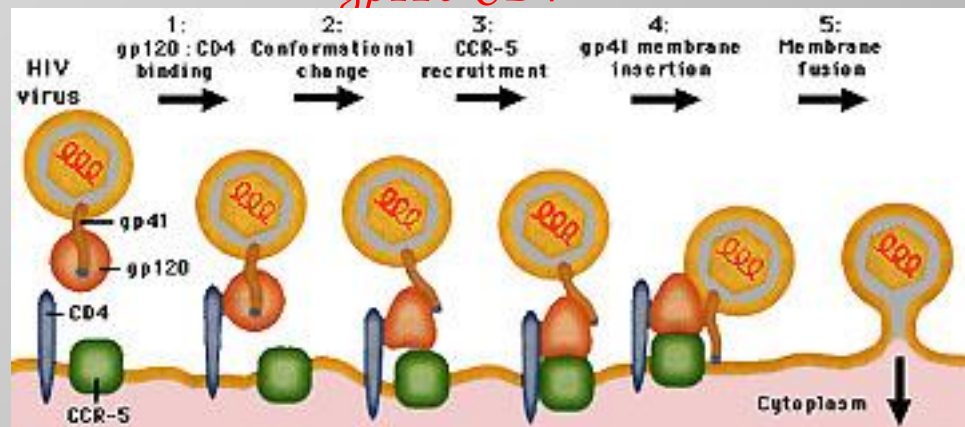
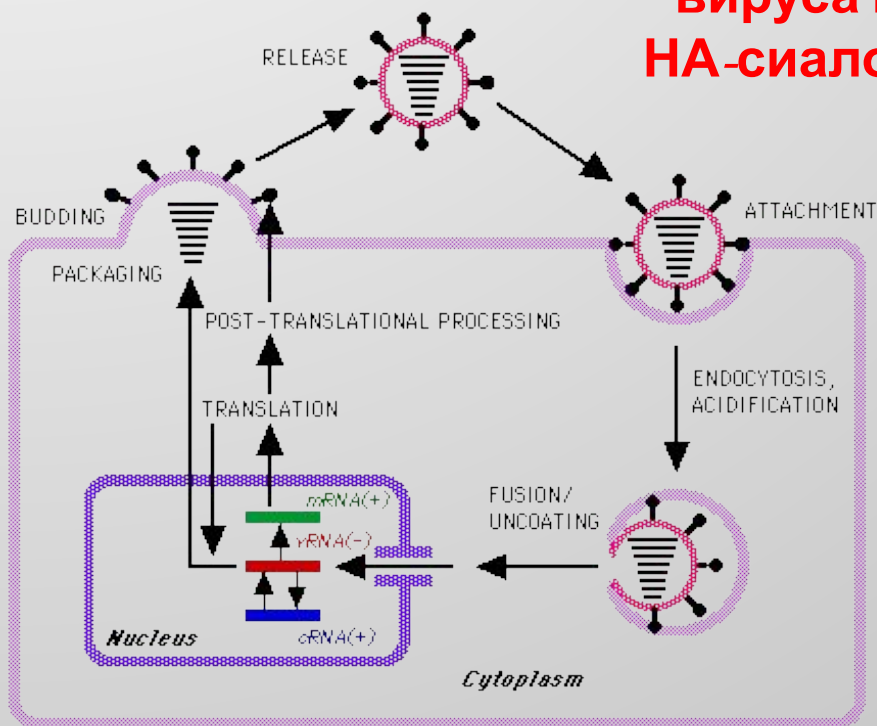
3. Прямая пенетрация

Виропексис (на примере вируса гриппа)

HA-сиаловая к-та

Слияние мембран (на примере ВИЧ)

gp120-CD4



Этапы взаимодействия вируса с клеткой

- ▣ **3. Депротеинизация («раздевание вируса»)**. С поверхности нуклеокапсида удаляется матриксный белок М, в результате нуклеокапсид приобретает функциональную активность и проникает в цитоплазму, вирус гриппа – в клеточное ядро.
- ▣ **4. Проникновение нуклеиновой кислоты**
- ▣ **ДНК-вирусы:** встраивание генома вируса в геном клетки хозяина (вирус гепатита В, герпесвирусы)
- ▣ **РНК-ретровирусы:** геномная РНК переписывается на ДНК с помощью обратной транскриптазы (РНК-зависимая ДНК-полимераза) и эта ДНК – провирус встраивается в геном клетки.

Этапы взаимодействия вируса с клеткой

- Фаза экспрессии вирусного генома:
- **5. Репликация** - экспрессия ранних и поздних генов и синтез белка в направлении ДНК - иРНК - белок.
- **6. Сборка вирионов, морфогенез** с последующим выходом из клетки-мишени путем почкования (вирусы с оболочкой) или лизиса клетки (вирусы без оболочки)

Транскрипция (переписывание информации с ДНК на РНК) и трансляция (синтез белка на молекуле РНК) вирусного генома

Геном вирусов содержит или РНК, или ДНК (РНК- и ДНК- вирусы соответственно). Выделяют позитивную (+) РНК (пикорнавирусы), обладающую матричной активностью и соответственно - инфекционными свойствами, и негативную (-) РНК (парамиксовирусы), не проявляющую инфекционные свойства, которая для воспроизводства должна *транскрибироваться* (превращаться) в +РНК. Механизмы репродукции различных вирусов очень сложные и существенно отличаются. Основные их схематические варианты представлены ниже.



Репродукция вируса в клетке



Взаимодействие вирусов с клеткой хозяина

▣ Взаимодействие идет в единой биологической системе на генетическом уровне. Существует четыре типа взаимодействия:

▣ 1) *продуктивный тип* (взаимодействие, в результате которого происходит репродукция вируса, вызывая гибель (лизис) клетки);

▣ 2) *абортивный тип* (взаимодействие, при котором репродукции вируса не происходит, а клетка восстанавливает нарушенную функцию);

▣ 3) *интегративный тип* или вирус-индуцированная трансформация клетки (встраивание (интеграция) вирусной ДНК в виде провируса в хромосому клетки и их совместная репликация, при этом клетка, инфицированная вирусом, приобретает новые, ранее не присущие ей свойства);

▣ 4) *латентная вирусная инфекция* (идет репродукция вируса, а клетка сохраняет свою функциональную активность).

Генетика вирусов

- ▣ Генофонд вирусов создается и пополняется из четырех основных источников:
- ▣ двух внутренних (мутации, рекомбинации)
- ▣ и двух внешних (включение в геном генетического материала клетки хозяина, поток генов из других вирусных популяций).

КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

Основные признаки, используемые для современной классификации вирусов

- 1. тип нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), ее структура;
- 2. наличие липопротеидной оболочки;
- 3. стратегия вирусного генома;
- 4. размер и морфология вириона, тип симметрии, число капсомеров;
- 5. феномены генетических взаимодействий;
- 6. круг восприимчивых хозяев;
- 7. патогенность;
- 8. географическое распространение;
- 9. антигенные свойства

Таксоны, применяемые в вирусологии

1. Царство *Vira*

2. Подцарство

- ДНК-геномные вирусы

- РНК-геномные вирусы

3. Семейство

Название таксона заканчивается на – *viridae*

4. Подсемейство

Название таксона заканчивается на – *virinae* (существует у некоторых семейств)

5. Род

Название таксона заканчивается на – *virus*. Основной таксон в классификации вирусов

6. Вирус

7. Серовары

По антигенной структуре

Основные методы культивирования вирусов

- 1. **В организме лабораторных животных:** например, белых мышей (вирусы гриппа, Коксаки), кроликов (вирус бешенства). Индикацию, то есть обнаружение вируса, проводят на основании развития типичных признаков заболевания и изменений органов животных.

К лабораторным животным предъявляют строгие требования.

Животные должны быть в достаточной степени восприимчивы к инфекции данным вирусом и не нести в себе латентной инфекции и каких-либо паразитов. В эксперимент берут животных одного пола, возраста, массы, лучше из одного питомника или партии. После заражения особей вирусосодержащим материалом важно своевременно и правильно взять материал для дальнейшего исследования. Результаты выделения вируса считают положительными, если у животного после соответствующего инкубационного периода развиваются симптомы инфекции.



Основные методы культивирования вирусов: в курином эмбрионе (7-12-дневной)

Вирусный материал вводят в различные полости эмбриона, а через 48-72 ч. вскрывают и осматривают поражения. Способы заражения: открытый и закрытый.

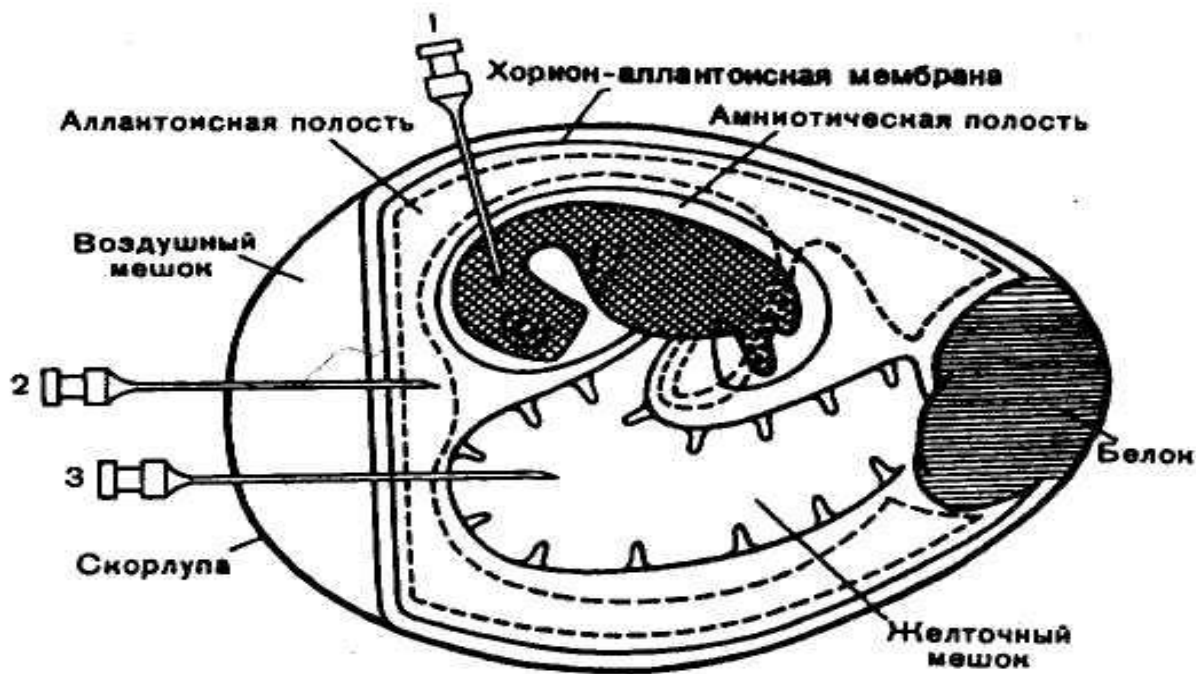
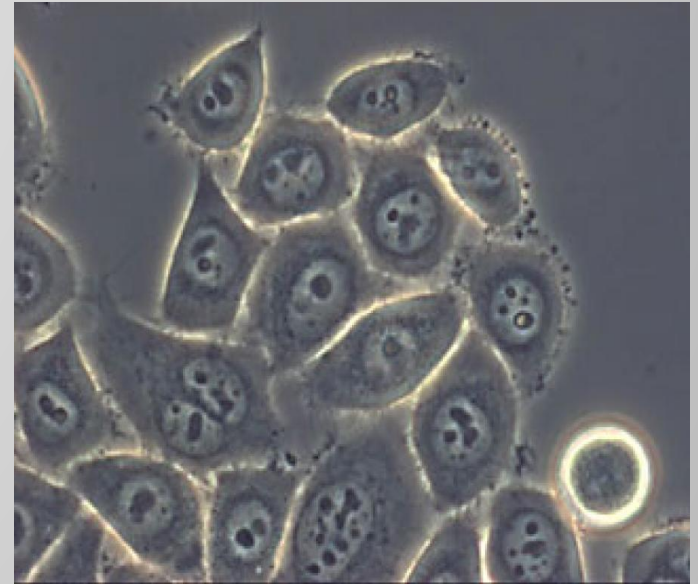
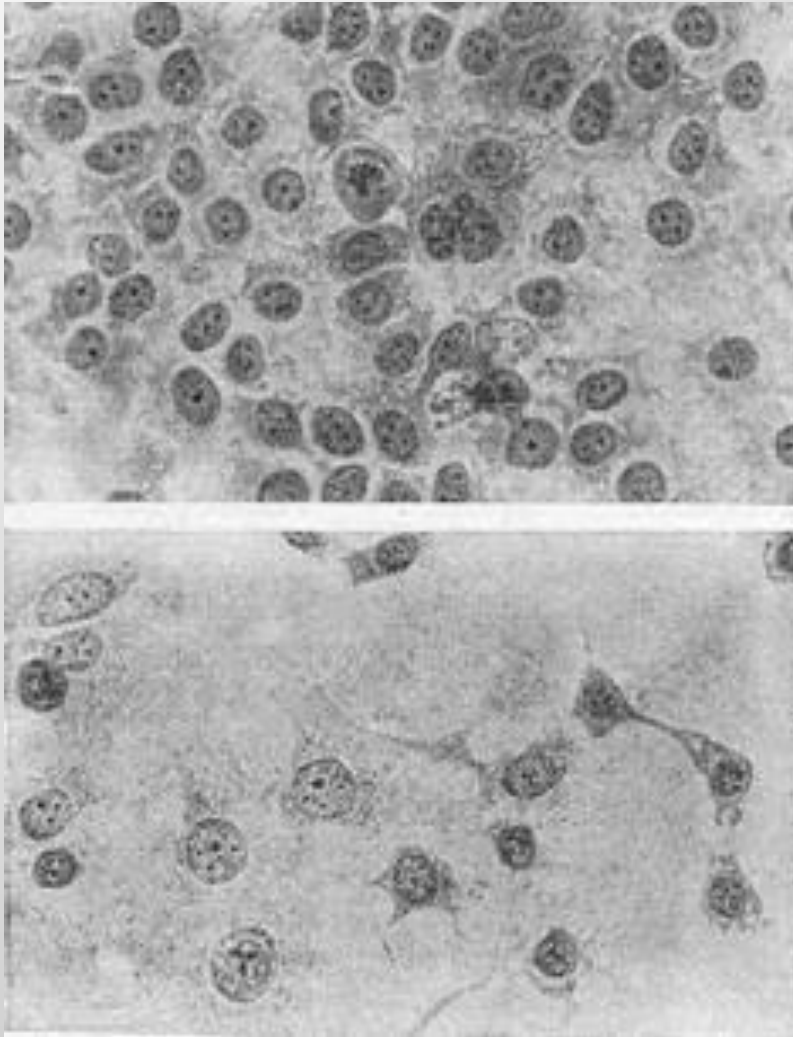


Рис.5.2.1. Способы заражения куриного эмбриона.

1 — в амниотическую полость; 2 — в аллантоисную полость; 3 — в желточный мешок.

Основные методы культивирования вирусов: в клеточных культурах



Однослойная культура клеток HeLa до заражения вирусом (вверху) и на 3-й день после заражения (внизу).

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. **Диплоидные (полуперевиваемые) культуры** 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, HeLa - получена из карциномы шейки матки; Нер-2 - из карциномы гортани; Детройт -6 - из метастаза рака легкого в костный мозг; RH -из

Специальные питательные среды для культур клеток

- Используются разнообразные синтетические вирусологические питательные среды сложного состава, включающие большой набор различных факторов роста - среда 199, Игла, раствор Хэнкса, гидролизат лактальбумина. В среды добавляют стабилизаторы рН (Нерес), 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.

Способы обнаружения (индикации) вирусов в клеточных культурах

- ▣1. **Цитопатическое действие (ЦПД).** В результате размножения вирусов в клетках происходят морфологические изменения клеток (вакуолизация цитоплазмы, деструкция митохондрий, округление клеток). Часть клеток погибает и отслаивается от стекла. Вместо сплошного монослоя остаются отдельные клеточные островки.
- ▣2. **Выявление телец включений.** Включения - скопления вирусов в клетках. Они имеют различную форму и размеры. Их окрашивают по Романовскому-Гимзе или флюорохромами и наблюдают под микроскопом.
- ▣3. Выявление вирусов методом флюоресцирующих антител (ИФА), электронной микроскопией.
- ▣4. **Цветная проба.** Обычный цвет используемых культуральных сред, содержащих в качестве индикатора рН феноловый красный, при оптимальных для клеток условиях культивирования (рН около 7,2) - красный. Размножение клеток 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.

Способы обнаружения (индикации) вирусов в клеточных культурах

- 5. **Выявление гемагглютинаина вирусов - гемадсорбция** (Клетки, зараженные вирусами, могут адсорбировать эритроциты. Вирусы выходят на поверхность клеток и связывают эритроциты. Эритроциты добавляют к культуре и через некоторое время промывают физиологическим раствором. На поверхности клеток под микроскопом видны прилипшие эритроциты в виде разнообразных фигур), *гемагглютинация* (склеивание эритроцитов под влиянием вирусов).
- 6. **Метод бляшек (бляшкообразования)**. В результате цитолитического действия многих вирусов на клеточные культуры образуются зоны массовой гибели клеток. Выявляют бляшки - вирусные “клеточно-негативные” колонии.

Вирусы бактерий (бактериофаги)

- Естественной средой обитания фагов является бактериальная клетка, поэтому фаги распространены повсеместно (например, в сточных водах). Фагам присущи биологические особенности, свойственные и другим вирусам.
- Наиболее морфологически распространенный тип фагов характеризуется наличием головки-икосаэдра, отростка (хвоста) со спиральной симметрией (часто имеет полый стержень и сократительный чехол), шипов и отростков (нитей), т.е. внешне несколько напоминают сперматозоид.
- Взаимодействие фагов с клеткой (бактерией) строго специфично, т.е. бактериофаги способны инфицировать только определенные виды и *фаготипы*

хвостовой
отросток

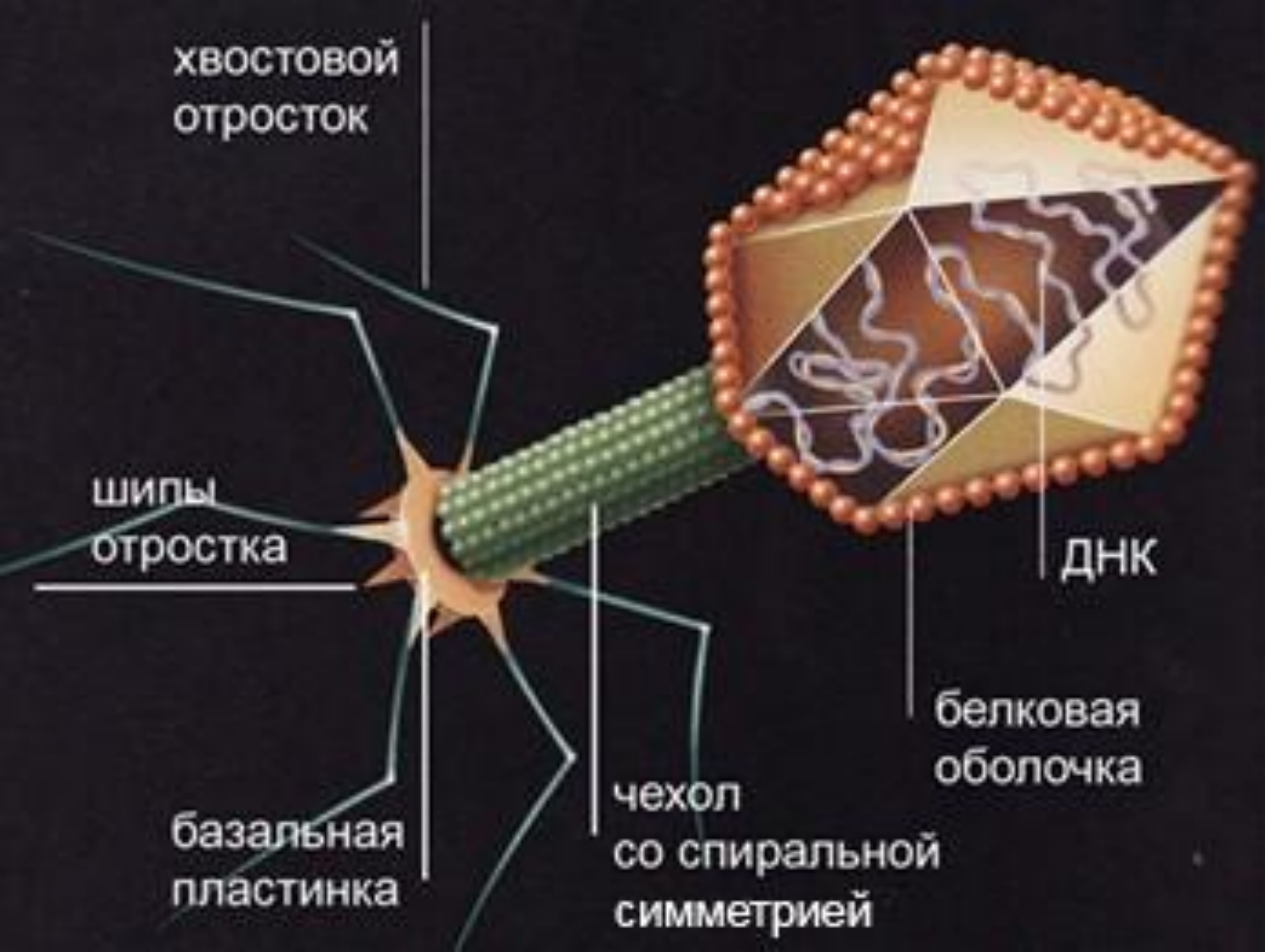
шипы
отростка

базальная
пластинка

чехол
со спиральной
симметрией

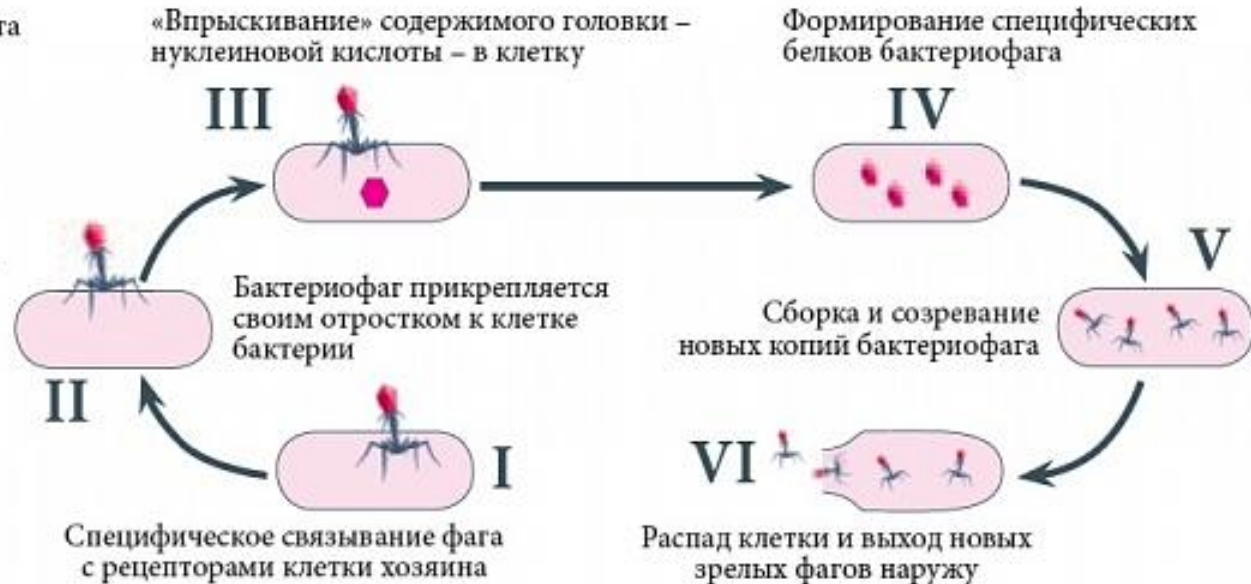
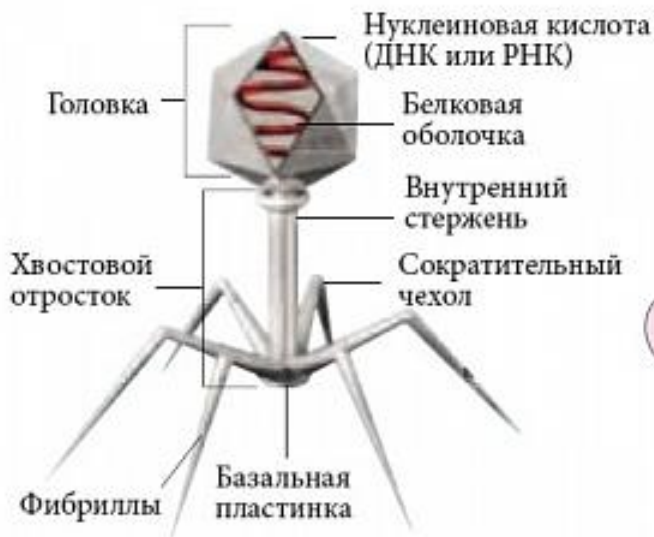
ДНК

белковая
оболочка



Основные этапы взаимодействия фагов и бактерий

- 1. **Адсорбция** (взаимодействие специфических рецепторов) (I-II).
- 2. **Внедрение вирусной ДНК** (инъекция фага) осуществляется за счет лизирования веществами типа лизоцима участка клеточной стенки, сокращения чехла, вталкивания стержня хвоста через цитоплазматическую мембрану в клетку, впрыскивание ДНК в цитоплазму (III).
- 3. **Репродукция фага** (IV-V).
- 4. **Выход дочерних популяций** (VI).



Основные свойства фагов

- ▣ *Вирулентные фаги*, способные вызвать продуктивную форму процесса;
- ▣ *умеренные фаги*, вызывающие редуцированную фаговую инфекцию (редукцию фага). При этом геном фага в клетке не реплицируется, а внедряется (*интегрируется*) в хромосому клетки хозяина (ДНК в ДНК), фаг превращается в *профаг*. Этот процесс получил название *лизогении*. Если в результате внедрения фага в хромосому бактериальной клетки она приобретает новые наследуемые признаки, такую форму изменчивости бактерий называют *лизогенной (фаговой) конверсией*.
- ▣ Бактериальную клетку, несущую в своем геноме профаг, называют *лизогенной*, поскольку профаг при нарушении синтеза особого белка-репрессора может перейти в литический цикл развития, вызвать продуктивную инфекцию с лизисом бактерии.

Основные свойства фагов

- Умеренные фаги имеют важное значение в обмене генетическим материалом между бактериями - в *трансдукции* (одна из форм генетического обмена). Например, способностью вырабатывать экзотоксин обладают только возбудитель дифтерии, в хромосому которого интегрирован умеренный профаг, несущий *оперон tox*, отвечающий за синтез дифтерийного экзотоксина. Умеренный фаг *tox* вызывает лизогенную конверсию нетоксигенной дифтерийной палочки в токсигенную.

По спектру действия на бактерии фаги разделяют на:

- *поливалентные* (лизиируют близкородственные бактерии, например сальмонеллы);
- *моновалентные* (лизиируют бактерии одного вида);
- *типоспецифические* (лизиируют только определенные фаговары возбудителя).

Практическое использование бактериофагов.

- 1. Для идентификации (определение фаготипа, т.н. фаготипирование).
- 2. Для фагопрофилактики (купирование вспышек).
- 3. Для фаготерапии (лечение дисбактериозов).
- 4. Для оценки санитарного состояния окружающей среды и эпидемиологического анализа.

Клетки иммунной системы

- Клетки, принимающие участие в становлении и функционировании иммунной системы, можно разделить на две группы:
 - 1. Основные клетки лимфоидного комплекса: Т-, В-лимфоциты и их субпопуляции;
 - 2. Вспомогательные клетки иммунной системы: макрофаги, дендритные клетки, натуральные киллеры.

Основные субпопуляции Т-клеток:

- ▣1. Цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ, Т-киллеры) – эффекторные клетки. Вызывают гибель клеток-мишеней, несущих на поверхности чужеродный антиген.
- ▣2. Т-супрессоры – регуляторные клетки. Ингибируют активность других клеток иммунной системы.
- ▣3. Т-хелперы – регуляторные клетки. Активируют макрофаги, стимулируют образование ЦТЛ, участвуют в аллергических реакциях, стимулируют размножение и активность натуральных киллеров, поддерживают пролиферацию Т-супрессоров. Индуцируют пролиферацию В-клеток и выработку ими иммуноглобулинов, синтезируют интерлейкины -4, -5, -6, -10.

Клетки врожденной иммунной системы:

- ▣ **НК-клетки** – нормальные киллеры, лимфоциты периферии. Не обладают структурами для специфического распознавания антигена. Способны убивать некоторые опухолевые, а так же инфицированные вирусами клетки. При активации выбрасывают перфорин, разрушающий мембрану модифицированной клетки.
- ▣ **Макрофаги** – фагоцитирующие мононуклеары. Участвуют в неспецифическом иммунитете, удалении отживших и разрушенных клеток собственного организма, презентации антигена, продуцируют разнообразные цитокины.
- ▣ **Дендритные клетки** расположены в тимусе, лимфатических узлах, тканях слизистых. Способны представлять антиген в иммуногенной форме и сохранять его для ускоренного развития вторичного иммунного ответа.

Клетки врожденной иммунной системы:

- **Главный комплекс гистосовместимости (МНС)** – группа близкосцепленных генов шестой хромосомы, кодирующих иммунологически значимые молекулы трех классов. Продукты данных генов – лейкоцитарные антигены (human leukocyte antigens – HLA) – определяют биологическую индивидуальность каждого человека. Все гены комплекса наследуются по кодоминантному типу.
- Продукты генов МНС I класса присутствуют на поверхности всех ядродержащих клеток и определяют специфичность организма. Играют важную роль в гуморальной регуляции, вовлечены в процессы дифференцировки при эмбриональном развитии.
- Белки МНС II класса присутствуют на поверхности В-лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток. Обеспечивают взаимодействие между Т-лимфоцитами и макрофагами. Т-хелперы распознают чужеродный антиген только в комплексе с белками МНС II класса.
- Продукты генов МНС III класса не участвуют в контроле иммунного ответа, основной их функцией является восстановление поврежденных белков в клетке.

Механизмы врожденного противовирусного иммунитета

- К механизмам врожденного иммунитета относятся НК-клетки и интерфероны.
- **НК-клетки** представляют собой крупные лимфоциты. Основной их функцией является цитолитическая, которая обеспечивается содержанием в гранулах этих клеток белка перфорины и сериновых эстераз. Нормальные киллеры являются продуцентами ряда цитокинов, а также интерферона γ .
- **Интерфероны** – основные факторы врожденной защиты от вирусов. Интерфероны индуцируют в клетке биосинтез ферментов, нарушающих репликативный цикл вируса, а также приводят к активации НК-клеток.

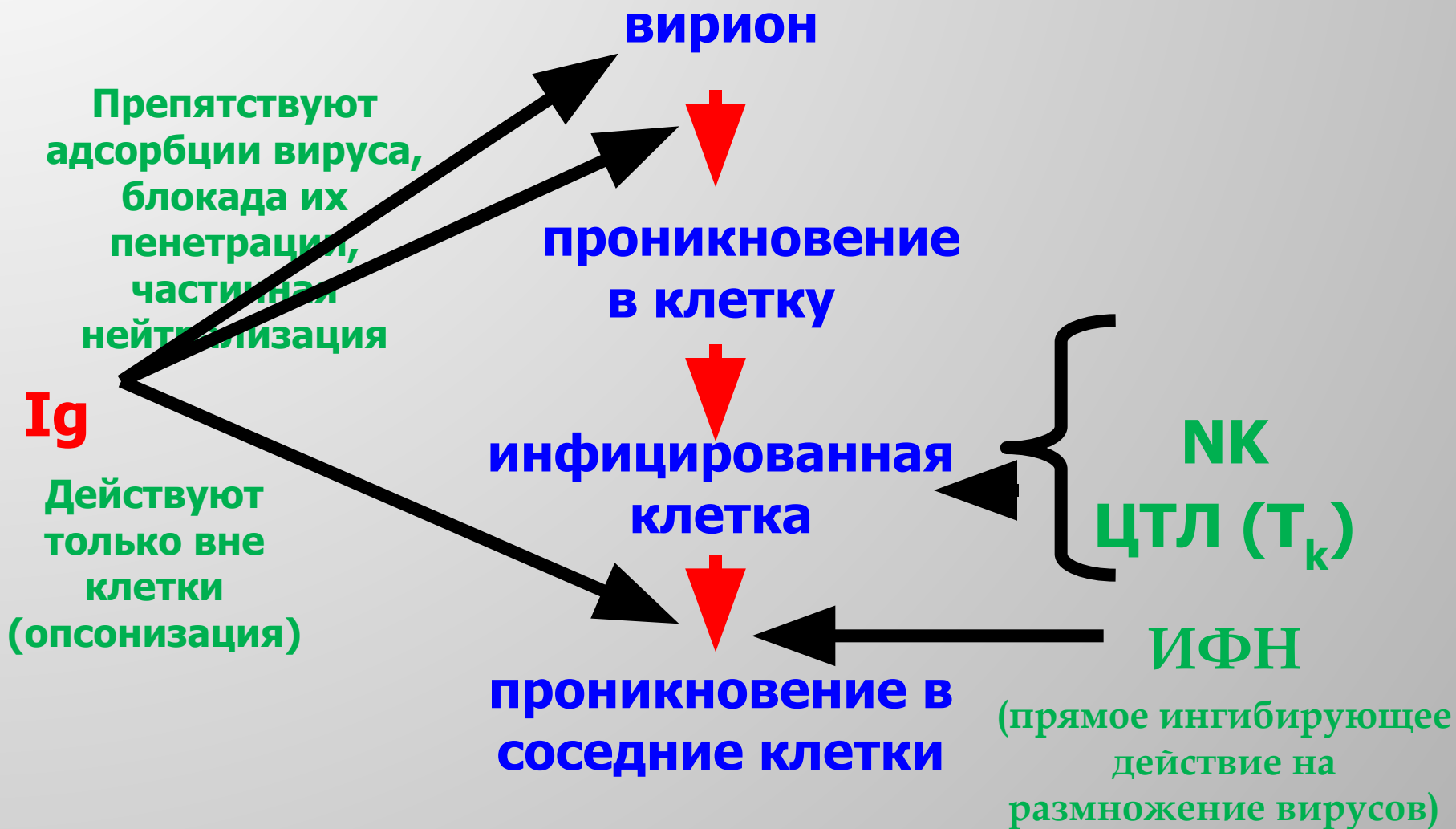
Механизмы адаптивного противовирусного иммунитета

- ▣ **Презентация антигена.** Способностью представлять (презентировать) антигены Т-лимфоцитам обладают антигенпрезентирующие клетки (АПК): дендритные клетки, макрофаги, В-лимфоциты. Представлению антигена предшествуют следующие стадии:
 - ▣ 1. Захват поступившего в организм антигена.
 - ▣ 2. Переработка (дезинтеграция) антигена.
 - ▣ 3. Формирование комплексов накопившихся антигенов с собственными молекулами МНС 1 класса.
 - ▣ 4. Транспортировка образовавшихся комплексов на мембрану АПК.
 - ▣ 5. Доставка образовавшихся комплексов во вторичные лимфоидные органы для представления Т-лимфоцитам.

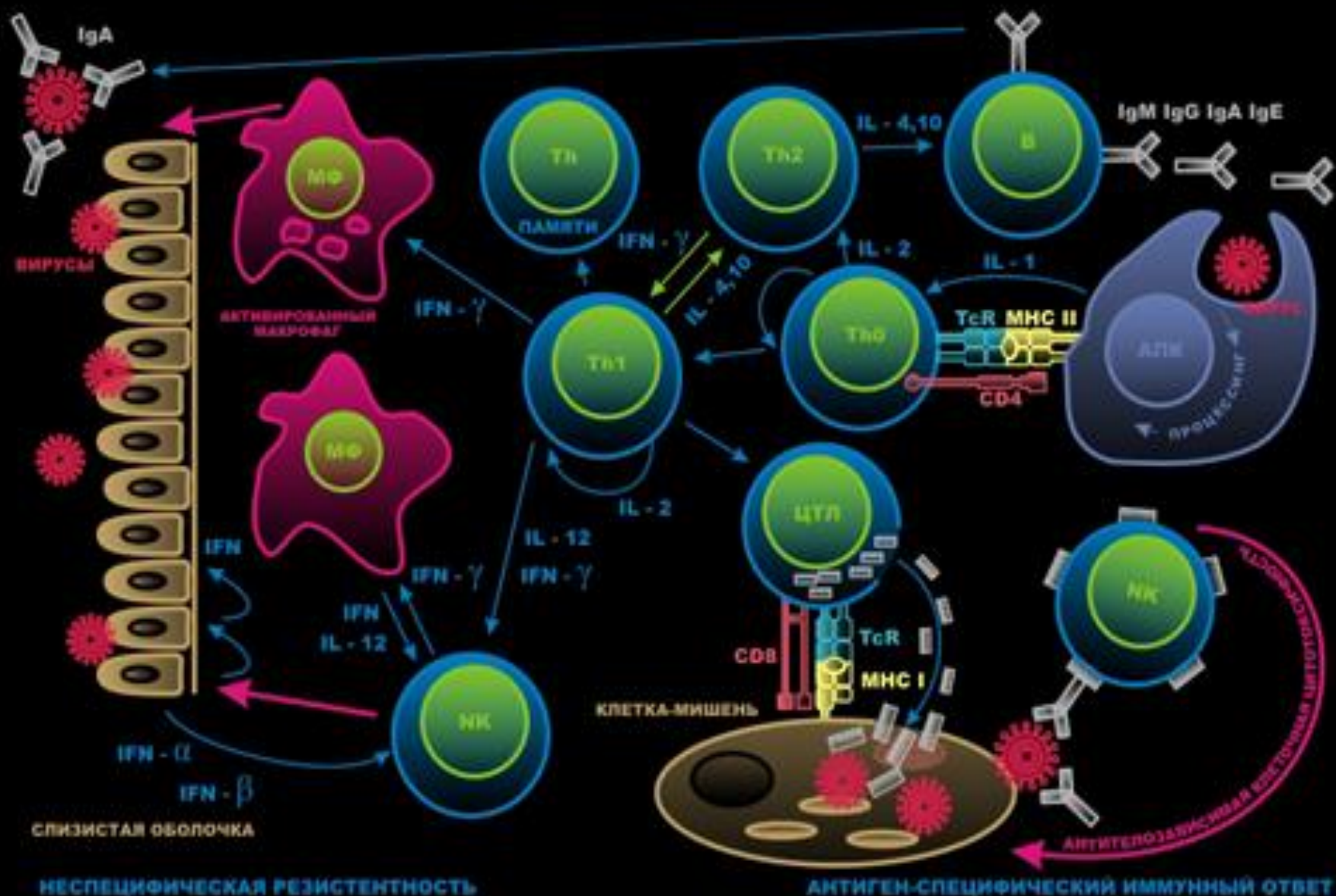
- ▣ Основные *эффектор*ные клетки при вирусной инфекции – **цитотоксические Т-лимфоциты** (Т-киллеры, ЦТЛ).
- ▣ **Этапы цитолитического действия ЦТЛ:** распознавание антигена наивными Т-лимфоцитами, пролиферация и дифференцировка до зрелых Т-эффекторов, лизис (гибель) клетки (апоптоз или некроз).

- ▣ **Гуморальный иммунный ответ**, направленный против внеклеточно расположенных вирионов: препятствие адсорбции вирусов на поверхности чувствительных клеток и нейтрализацию вирусов.

Действие факторов противовирусного иммунитета



ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ИММУНИТЕТ



ПАТОГЕНЕЗ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Патогенез вирусных инфекций – совокупность процессов, вызывающих заболевание и определяющих его развитие и исход. Патогенез определяется следующими факторами:

1. тропизмом вируса (чувствительность к вирусу определенных клеток, тканей и органов макроорганизма).
2. скоростью репродукции вируса и количеством инфекционных частиц в потомстве;
3. реакцией клетки на инфекцию;
4. реакцией организма на вызванные инфекцией изменения клеток и тканей.

Патогенез вирусных инфекций на клеточном уровне

Вирусы, репродуцируясь в клетке, обуславливают появление **цитопатического действия** (ЦПД) и **цитопатического эффекта** (ЦПЭ). Это специфическая морфологическая деструкция (ЦПД) или функциональная патология без разрушения (ЦПЭ).

Вирусы, которые вызывают ЦПД, называют *цитопатическими*.

Механизм возникновения и развития ЦПД - ЦПЭ:

1. Нарушение белкового синтеза клетки хозяина.
2. Нарушение проницаемости клеточных мембран
3. Патология лизосом.

Различают три типа ЦПД-ЦПЭ:

1. **Цитолитический тип.** Характеризуется общей деструкцией клеток. Этому явлению могут предшествовать сгущение цитоплазмы, округление или сморщивание клеток, пикноз ядра, разрушение митохондрий, подавление митоза (такой тип может быть вызван пикорнавирусами и др.).
2. **Трансформирующий тип.** Клетка при этом типе ЦПД не погибает, а приобретает способность к неограниченному размножению (**трансформация клетки**). Трансформацию вызывают онкогенные вирусы (вирус лейкоза, болезни Марека и др.).
3. **Индуктивный тип.** При этом типе ЦПД клетка не погибает и не трансформируется, а изменяет свои функции, в частности, способность приобретает способность продуцировать интерферон и другие вещества (например, репродукция вируса классической чумы свиней в макрофагах)

Исходя из механизмов развития внутри пораженной клетки цитопатических изменений выделяют четыре типа вирусных инфекций:

- а) **литическая** – при этом типе инфекции наблюдают морфологические изменения в зараженной клетке, резко снижается метаболизм, отмечается деструкция и гибель клетки. Для вируса характерна высокая продукция с формированием нового поколения вирусов.
- б) **персистентная** – в зараженной клетке отсутствует ЦПД и отмечается слабое нарушение метаболизма. При этом у вируса снижена репродукция (при определенных условиях вирус классической чумы свиней).
- в) **латентная** – при этом в клетке отсутствует ЦПД и нарушение метаболизма. Вирусный геном интегрируется с клеточным геномом. (вирус гепатита В).
- г) **трансформационная** – при этом меняется морфология клетки, клетка размножается неограниченно. В организме появляются опухоли.

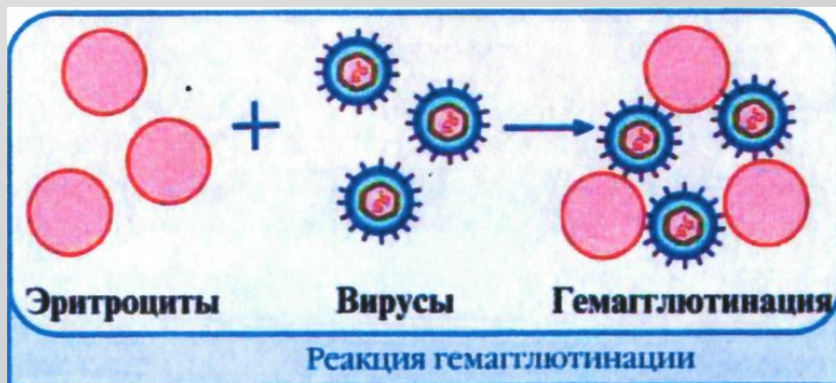
Методы диагностики вирусных инфекций

1. Цитологический
2. Вирусологический
3. Серологический
(Иммунологический)
4. Молекулярно-генетический

Иммунологические методы исследования

▣ **Реакция агглютинации** – склеивание корпускулярных антигенов антителами в присутствии электролитов, в результате чего выпадает осадок. В вирусологических исследованиях наиболее часто используют реакцию непрямой гемагглютинации.

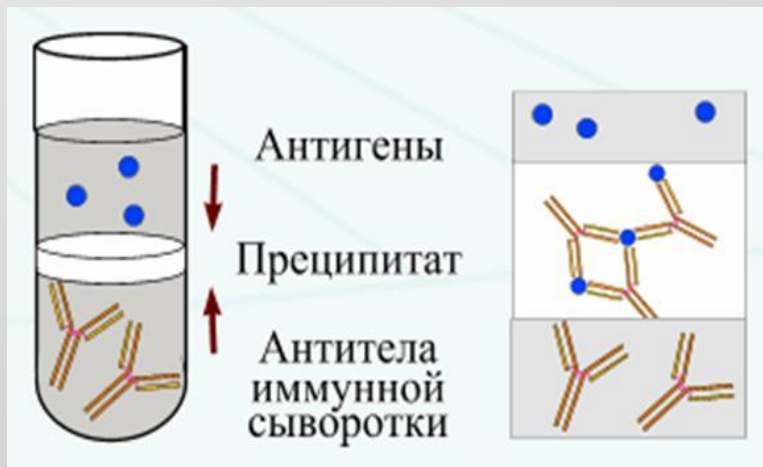
▣ **Гемагглютинация** – это склеивание эритроцитов, приводящее к образованию конгломератов, видимых невооруженным глазом. Особенностью метода является использование эритроцитов животных (барана, кролика) в качестве носителей вирусной антигенной детерминанты (сенсibilизированные эритроциты). О качестве реакции судят по характеру осадка: наличие фестончатого осадка свидетельствует о положительной реакции, плотный осадок в виде пуговки – об отрицательной реакции



Иммунологические методы исследования

▣ *Реакция преципитации* – иммунологическая реакция, основанная на осаждении комплекса растворимого молекулярного антигена с антителом, в результате чего появляется помутнение (преципитат).

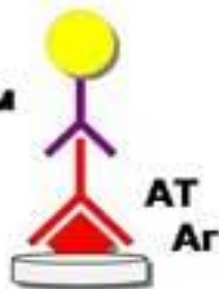
▣ *Реакция нейтрализации* – иммунологическая реакция, основанная на способности антител специфически подавлять (нейтрализовать) биологическую активность вируса в различных тест-системах – организме животных, куриных эмбрионах, культуре клеток.



■ **Иммуноферментный анализ (ИФА)** – метод количественного определения антител и антигенов, в котором используются антитела, меченные ферментом, и, в результате ферментативной реакции изменяется цвет одного из компонентов. В качестве фермента используется пероксидаза хрена, β -галактозидаза или щелочная фосфатаза. При добавлении к ферменту его субстрата и хромогена, последний изменяет окраску. Интенсивность окраски хромогена прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител. Изменение окраски определяют спектрофотометрически – по оптической плотности окрашенного раствора

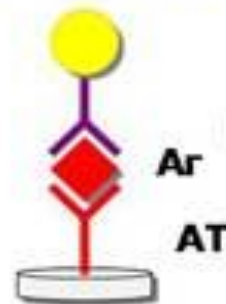
Иммуноферментный анализ (ИФА)

Антитела к АТ,
меченные ферментом



Выявление антител

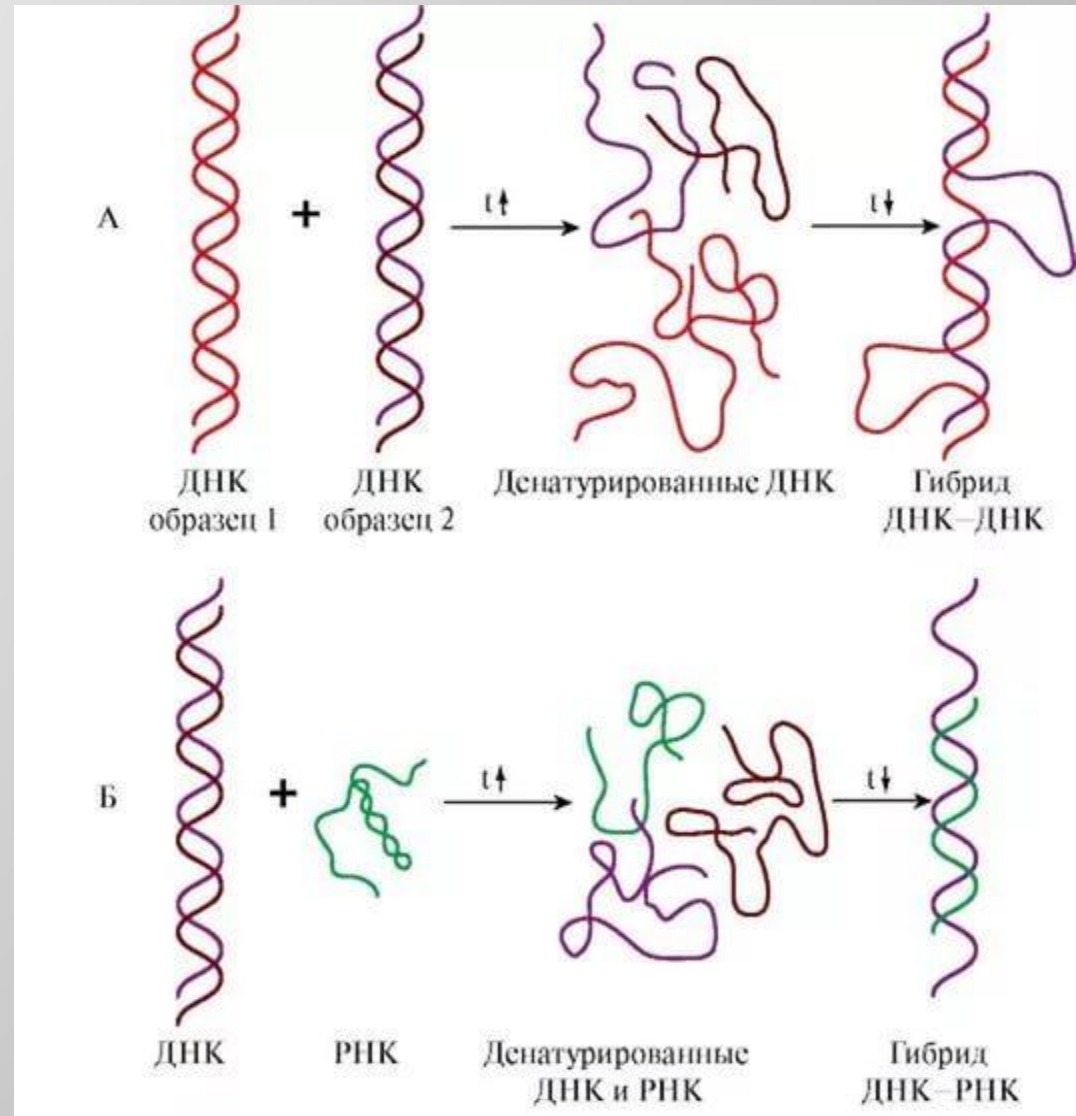
Антитела к Аг,
меченные ферментом



Выявление антигена

Молекулярно-генетические методы

Метод молекулярной гибридизации основан на гибридизации вирусной ДНК или РНК с помощью известного зонда, меченного радиоактивным изотопом или флюоресцирующим красителем. Специфичность и чувствительность теста зависит от структуры используемого зонда, биологических особенностей вируса, условий транспортировки и хранения материала от больных. Метод может быть использован не только для выявления вирусных частиц в патологическом материале, но и для обнаружения и идентификации вирусов в объектах окружающей среды.



Молекулярно-генетические методы

■ *Полимеразная цепная реакция (ПЦР)* – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале. ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику вирусных заболеваний. Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

- Для проведения ПЦР необходимы следующие **компоненты**:
 - ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать;
 - два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК;
 - термостабильная ДНК-полимераза-фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК;
 - дезоксинуклеозидтрифосфаты;
 - ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы;
 - буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции.
- Процесс амплификации включает многократное повторение определенных циклов. Каждый цикл состоит из следующих стадий:
- денатурация** (разрыв двуцепочечной ДНК-матрицы с образованием одноцепочечных ДНК);
 - отжиг** (образование связи между праймерами и одноцепочечной матрицей);
 - элонгация** (достройка праймеров на матрице ДНК и образование



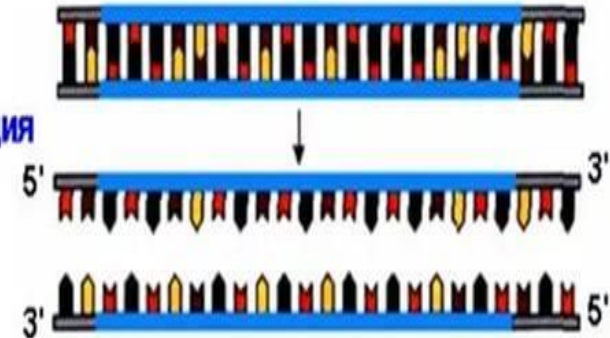
ПЦР – полимеразная цепная реакция

1-й цикл ПЦР

1 этап

Денатурация

93-95 °C



Искомый фрагмент ДНК

2 этап

Гибридизация праймеров

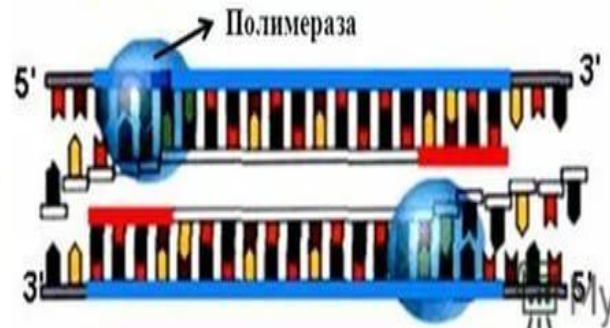
50-65 °C



3 этап

Синтез цепи ДНК

72 °C



Спасибо за внимание!

