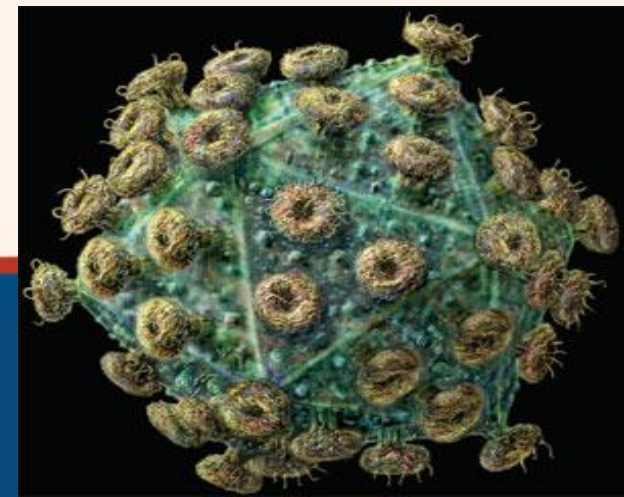


Ставропольский государственный медицинский  
университет

Кафедра микробиологии

Занятие 7

# Тема занятия: Общая вирусология



# План занятия

## А. Обсуждаемые вопросы:

1. Обсуждение теоретических и практических вопросов по теме занятия по схеме:

### I. Характеристика возбудителя

1. Историческая справка
2. Таксономия (семейство, род, вид(ы))
3. Основные биологические свойства (морфология, ультраструктура, тинкториальные, культуральные, биохимические, резистентные, антигенные свойства, факторы патогенности, патогенность для животных)

II. Эпидемиология (источники инфекции, пути передачи и входные ворота инфекции).



- III. Краткая характеристика заболевания
  - 1. Принцип патогенеза и основные клинические формы.
  - 2. Особенности иммунитета.
  
- IV. Микробиологические методы диагностики (исследуемый материал, используемые питательные среды, экспресс – методы диагностики, а также методы индикации и идентификации).
  
- V. Общая характеристика медико-биологических препаратов по следующей схеме:
  - 1. Что содержит препарат?
  - 2. Как его получают?
  - 3. Для чего его применяют?

## **Б. Практическая работа:**

Методы лабораторных исследований при вирусных заболеваниях:

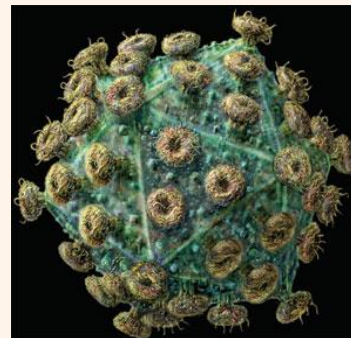
- 1. Вирусоскопический: микроскопия мазков с внутриклеточными включениями (Тельца Бабеша-Негри, Морозова-Пашена, Гварниери, мазок-отпечаток со слизистой носа, РИФ)



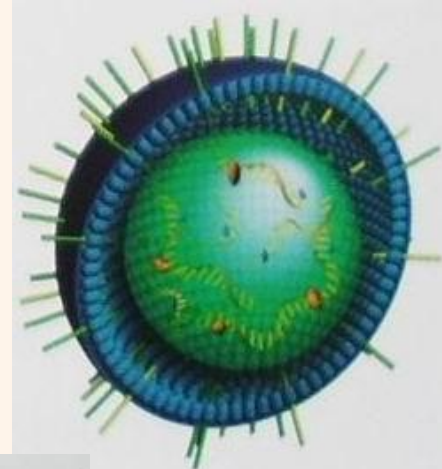
1. Вирусологический:
  - a) выделение вирусов из инфекционного материала (культура клеток, куриный эмбрион, животные);
  - b) определение вируса в материале (ЦПД, РА, РГА, цветная проба, гемадсорбции);
  - c) идентификация выделенного вируса (РСК, преципитации, РИФ, РТГА, реакция нейтрализации вируса и др.).
  
3. Биологический: методы заражения животных, определение вирусного инфицирования. Реакция нейтрализации вируса на животных.
  
4. Серологический:
  - a) реакции иммунитета, РТГА, РН, РСК, РИФ, ИФА, РНГА, преципитации, задержки ЦПД и др.
  - b) Учет реакции нейтрализации для обнаружения титра антител (цветная пробы, РН).

**Вирусы**- это автономные генетические структуры, имеющие ультрамикроскопические размеры, являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами, обладающие одним типом нуклеиновой кислоты(ДНК или РНК), не имеющие собственной белок-синтезирующей системы и размножающиеся особым типом-дизъюнктивно (т.е. разобщенно) и относящиеся к царству Virea.

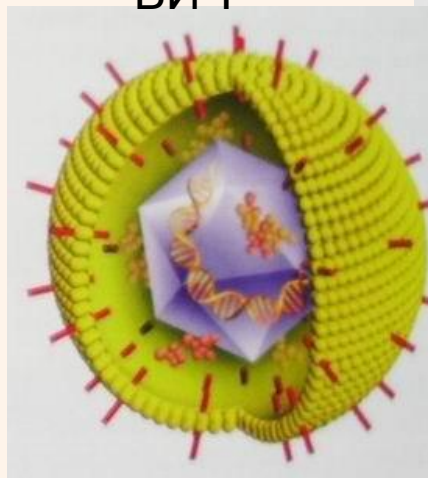
Примеры вирусных заболеваний: вирус возбудителя гриппа, кори, полиомиелита, ветряной оспы, краснухи, паротита, гепатита, ВИЧ



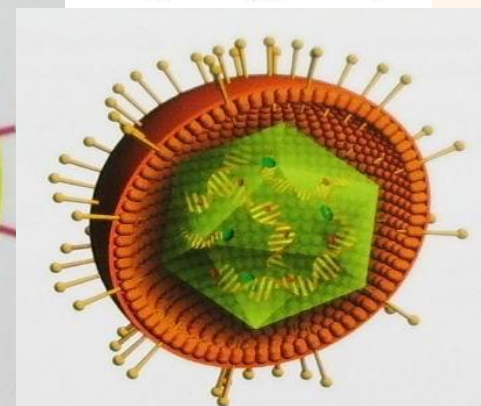
ВИЧ



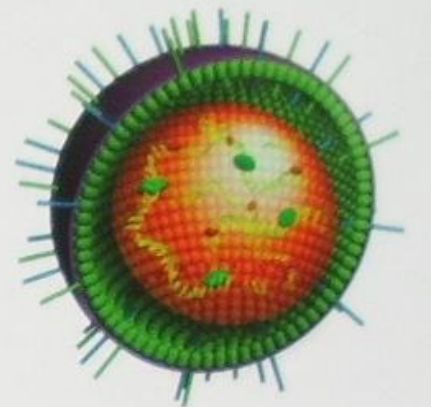
Строение вируса возбудителя кори



Строение вируса возбудителя ветряной оспы (опоясывающего герпеса)



Строение вируса возбудителя краснухи



Строение вируса возбудителя паротита

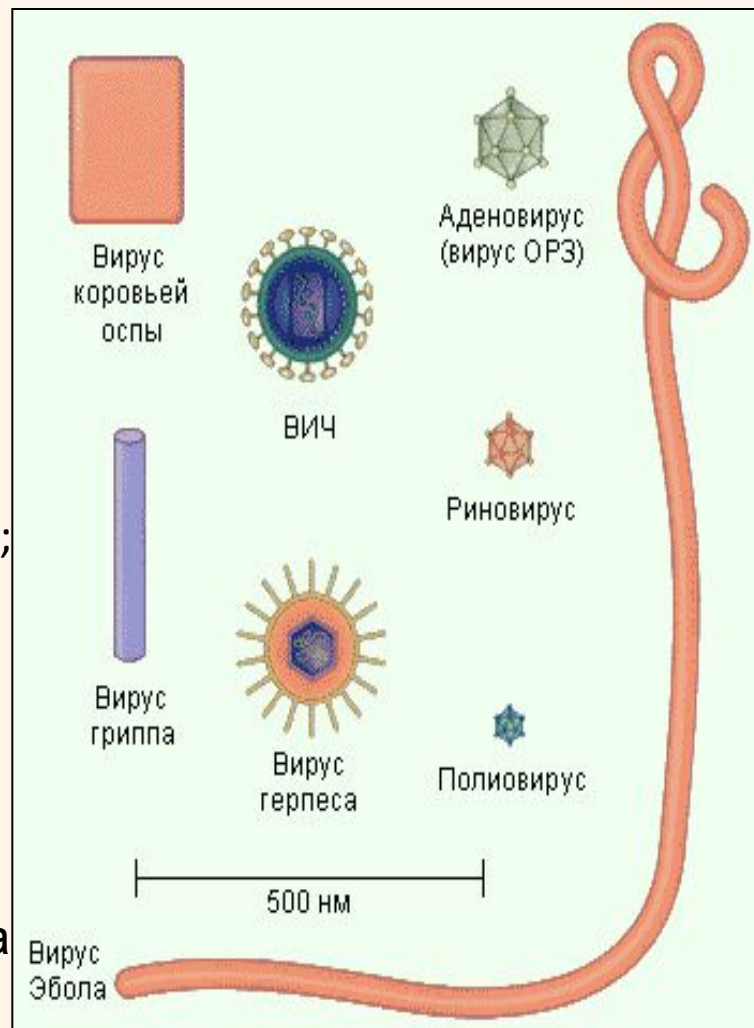
СТАВРОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ



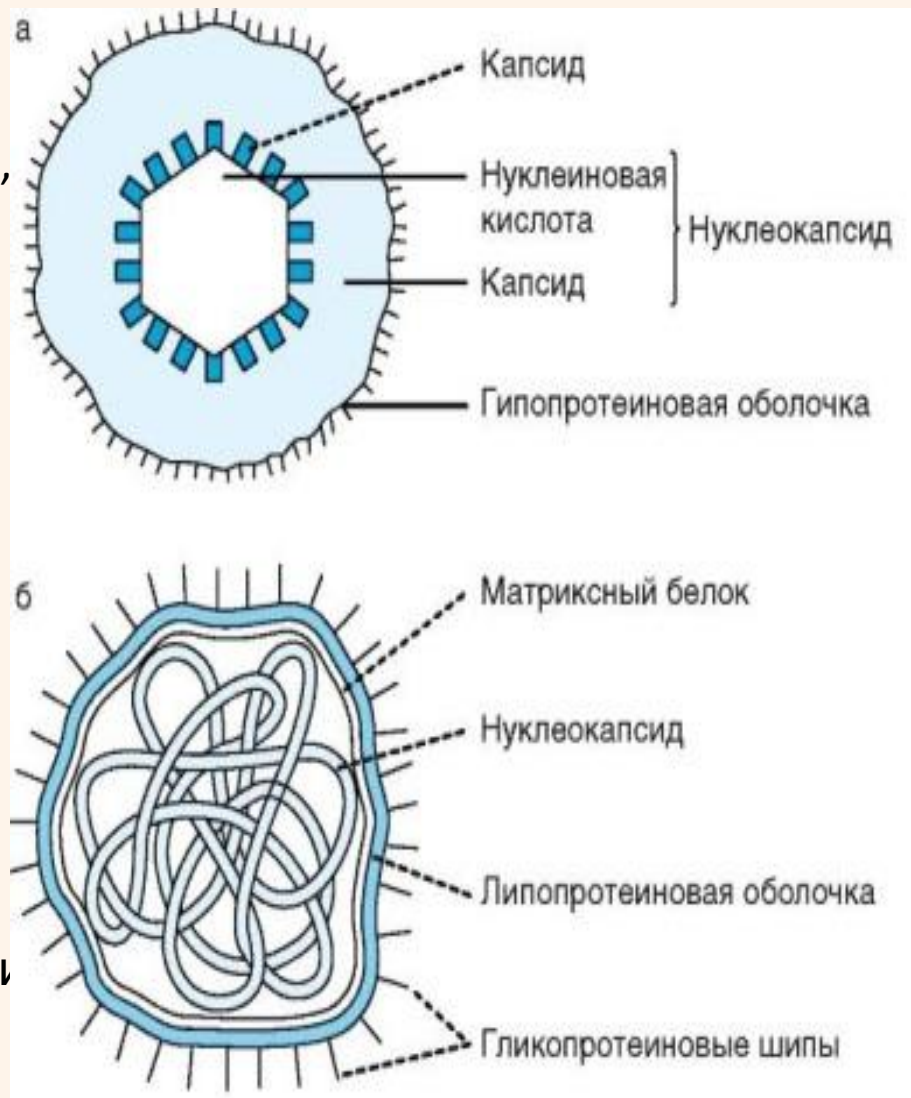
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

# Классификация вирусов

1. По размеру:
  - а. маленькие( 15-100 нм, вирус полиомиелита);
  - б. средние(100-300 нм);
  - в. крупные(300-350 нм, вирусы натуральной оспы).
2. По форме:
  - а. палочковидные(вирус табачной мозаики);
  - б. нитевидные(филовирусы);
  - в. пулеобразные(вирус бешенства);
  - г. шаровидные(вирусы полиомиелита);
  - д. в виде сперматозоида(бактериофаги).
3. По строению:
  - а. простые(безоболочечные, вирус гепатита А);
  - б. сложные(оболочечные, вирус гриппа).



4. По типу симметрии:
  - a. спиральный(вирус гриппа);
  - b. икосаэдрический(кубический, вирус герпеса);
  - c. сложный.
5. По типу нуклеиновой кислоты:
  - a. ДНК
  - b. РНК
6. По количеству нитей:
  - a. двунитевые
  - b. Однонитевые
7. По способу размножения;
8. По способу передачи вирусов;
9. По географическому расположению;
10. По хозяину;
11. По антигенным свойствам;



**Рис.** Строение оболочечных вирусов с икосаэдрическим (а) и спиральным (б) капсидом

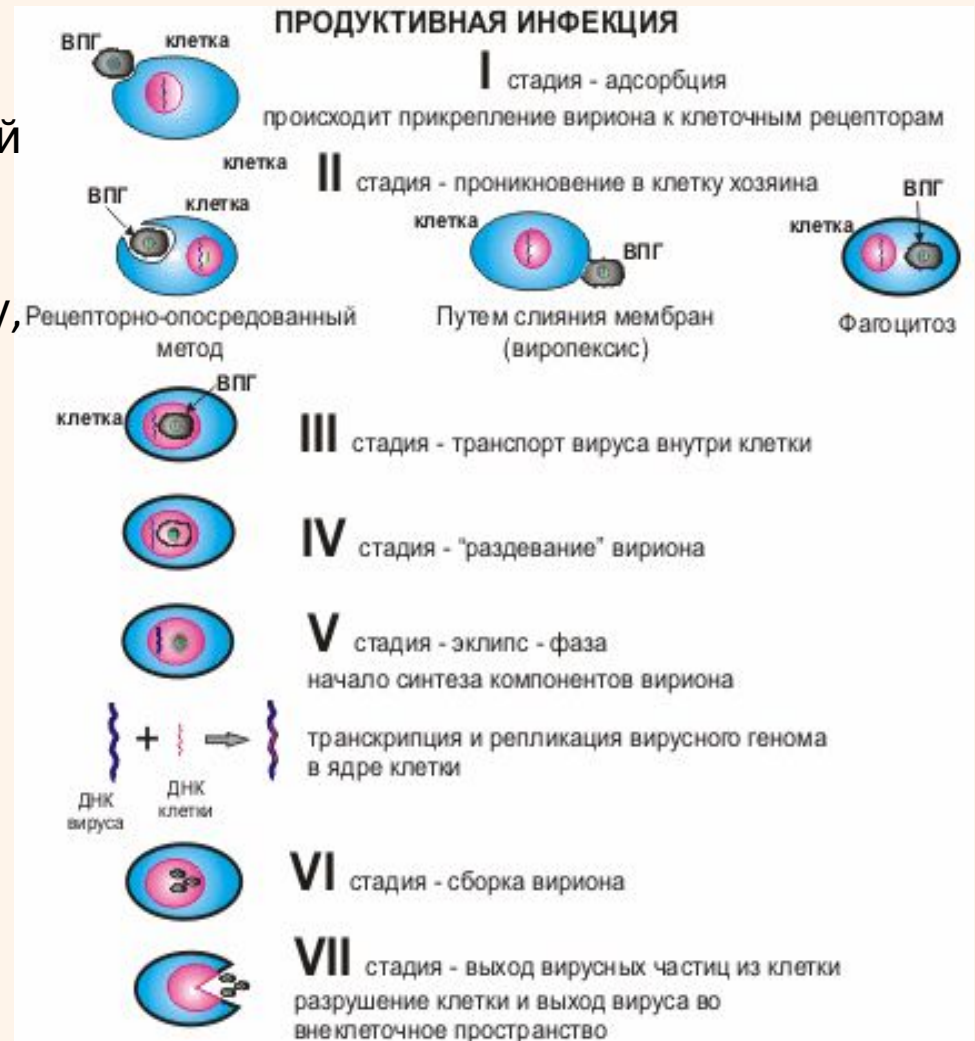
## Типы взаимодействия вируса с клеткой:

- ✓ *Продуктивный тип* взаимодействия завершается воспроизводством вирусного потомства – многочисленных вирионов и гибелью зараженных клеток (цитотоксическое действие). Некоторые вирусы выходят из клеток, не разрушая их (нецитотоксическое действие);
- ✓ *Абортивный тип* взаимодействия не завершается образованием новых вирионов, поскольку инфекционный процесс в клетке прерывается на одном из этапов;
- ✓ *Интегративный тип* взаимодействия, или вирогенеза, характеризуется встраиванием (интеграцией) вирусной ДНК в виде провируса в хромосому клетки и их совместной репликацией.



# Этапы взаимодействия вируса с клеткой:

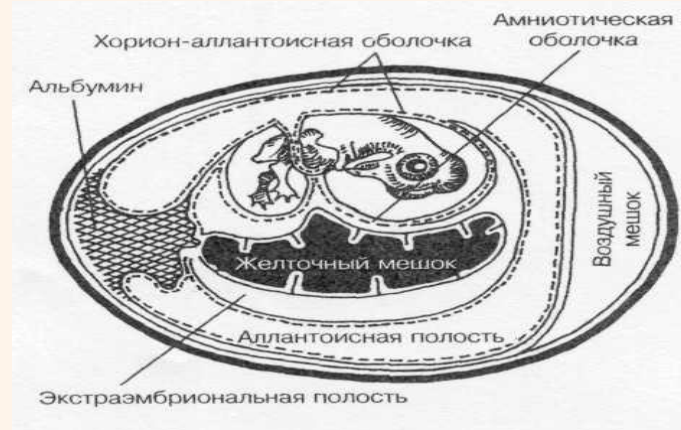
1. Адсорбция вириона на клеточной мембране;
2. Проникновение вириона в клетку, «раздевание» и высвобождение вирусного генома (депротеинизация вируса);
3. Синтез вирусных компонентов;
4. Сборка реплицированной нуклеиновой кислоты и новых капсидных белков;
5. Выход вирусного потомства из клетки.



# Микробиологическая диагностика

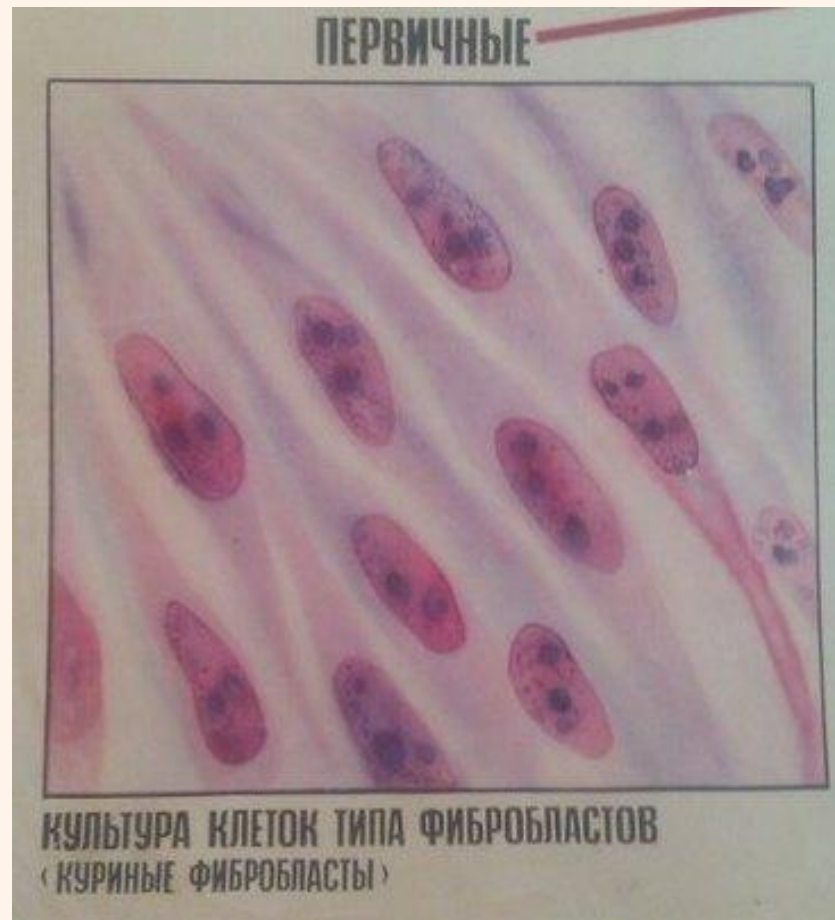
## Вирусологический метод диагностики

1. *Накопление вирусологического материала.* Для культивирования вирусов используют:
- ✓ культуры клеток
  - ✓ культуры тканей
  - ✓ куриные эмбрионы
  - ✓ чувствительных лабораторных ЖИВОТНЫХ



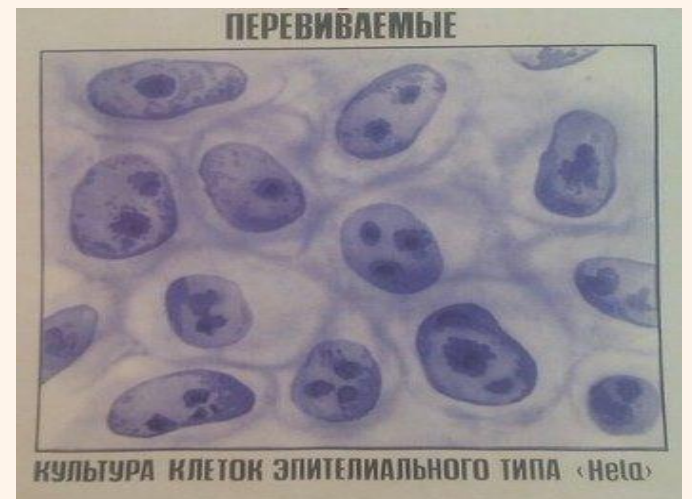
**Культуры клеток** представляют собой соматические или эмбриональные клетки животных или человека, культивируемые в лабораторных условиях. Их подразделяют на первичные (неперевиваемые), полуперевиваемые и перевиваемые.

**Первичные культуры клеток** получают непосредственно из тканей многоклеточных организмов. Такие клетки обычно не способны к делению (неперевиваемые) и используются однократно.



*К полуперевиваемым клеткам* относятся диплоидные клетки различных тканей и органов, способные к ограниченному размножению in vitro.

*Перевиваемые культуры* клеток готовят из злокачественных линий клеток, обладающих способностью неограниченно размножаться in vitro в определенных условиях. К ним относятся, например, злокачественные клетки HeLa, первоначально выделенные из карциномы шейки матки и др.

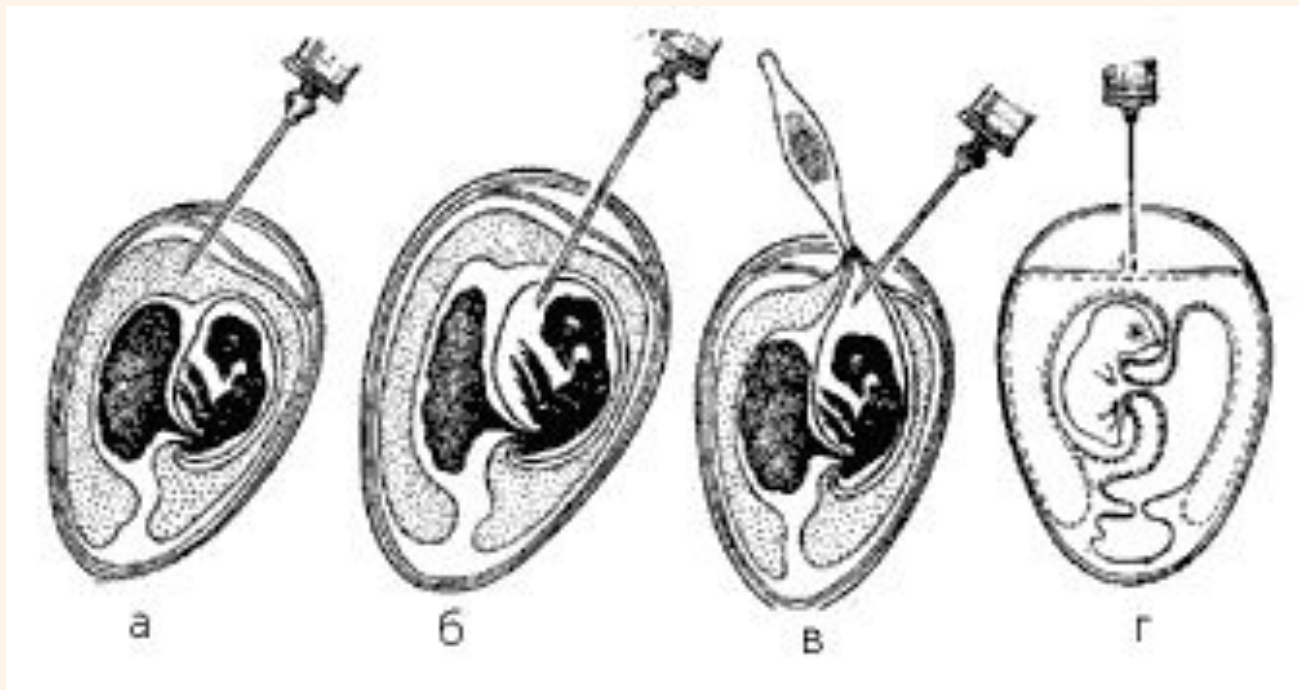


СТАВРОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ



МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

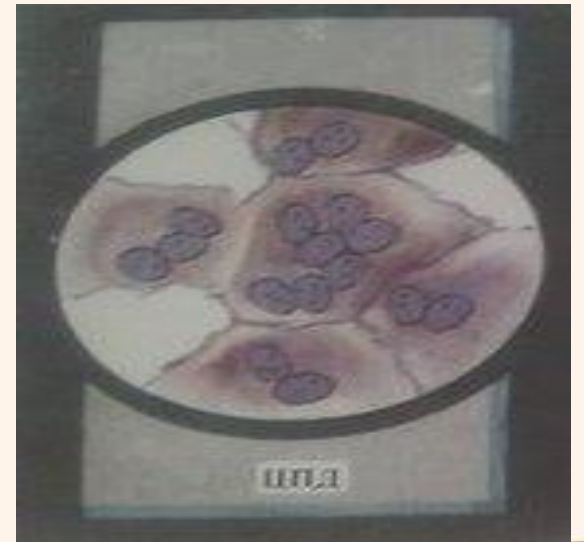
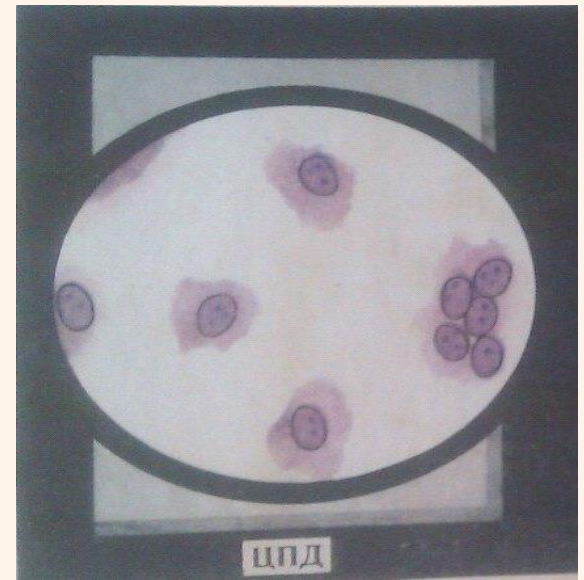
**Куриные эмбрионы.** Для культивирования используют 8-12-дневные куриные эмбрионы. Для заражения куриных эмбрионов исследуемый материал вводят в аллантаоисную и амниотическую полости, на хорион-аллантаоисную оболочку или в желточный мешок куриного эмбриона.



Методы заражения куриных эмбрионов: **а** – заражение в полость аллантаоиса; **б** – заражение в амнион закрытым способом; **в** – заражение в амнион открытым способом; **г** – заражение на хорионаллантаоисную оболочку

# Методы индикации вирусов:

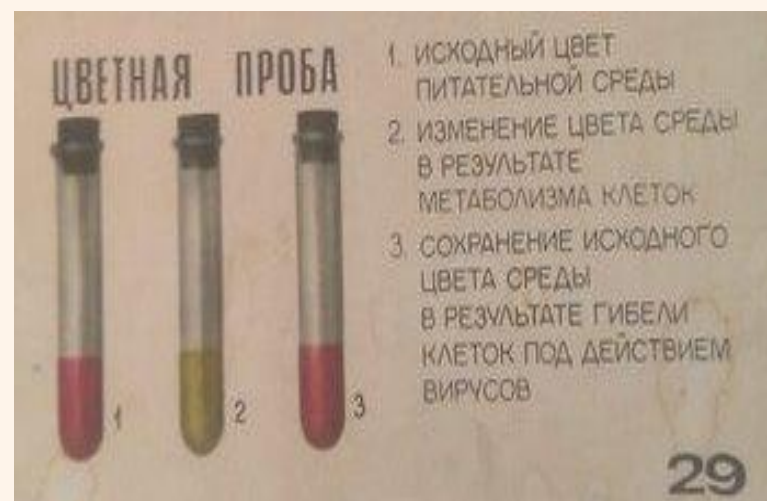
- а. О размножении (репродукции) вирусов в культуре клеток судят по цитопатическому действию (ЦПД), которое может быть обнаружено микроскопически по морфологическим изменениям клеток. Часть таких клеток погибает и отслаивается от стенок пробирки. Вирусные частицы, освобождающиеся при разрушении одних клеток, инфицируют другие, которые через некоторое время также погибают. В результате вместо сплошного клеточного монослоя остаются лишь отдельные клеточные островки.



б. Некоторые вирусы можно обнаружить и идентифицировать по включениям, которые они образуют в ядре или цитоплазме заражённых клеток.

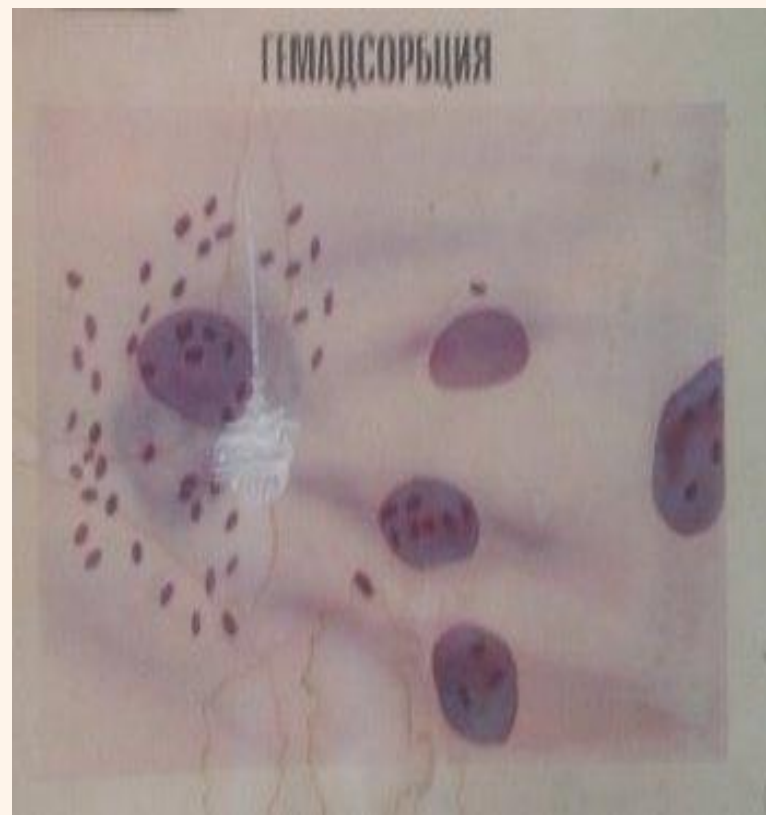


в. ЦПД вирусов можно также продемонстрировать с помощью «цветной пробы»: метаболически активные клетки культуры в ходе жизнедеятельности выделяют кислые продукты, что вызывает изменение индикаторов, присутствующего в культуральной среде.



d. Реакция гемадсорбции

применяют для индикации гемагглютинирующих вирусов. Реакция основана на способности поверхности клеток, в которых репродуцируются такие вирусы, адсорбировать эритроциты. Для постановки реакции гемадсорбции в культуру клеток, зараженных вирусами, добавляют взвесь эритроцитов и после некоторого времени контакта клетки промывают изотоническим раствором хлорида натрия. На поверхности пораженных вирусами клеток остаются прилипшие эритроциты.

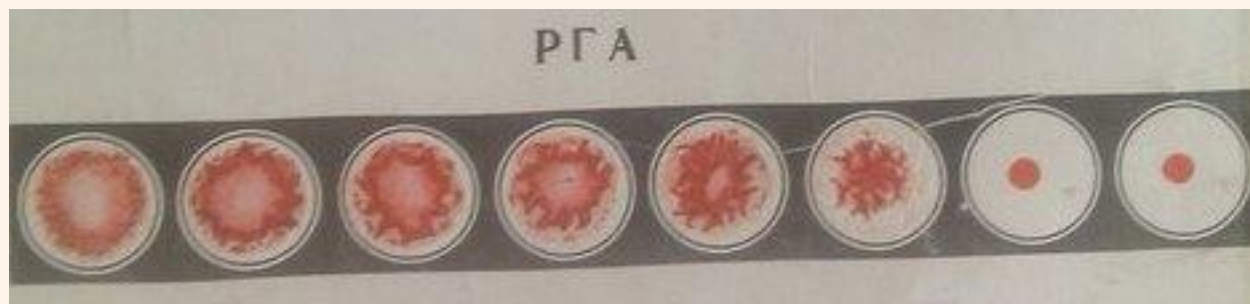




- е. **Реакцию гемагглютинации (РГА)** применяют для обнаружения гемагглютинирующих вирусов в культуральной жидкости зараженной культуры клеток либо хорионаллантоисной или амниотической жидкости куриного эмбриона. Для постановки РГА к исследуемому материалу добавляют взвесь эритроцитов. В присутствии вирусов происходит агглютинация эритроцитов.

Результаты реакции учитывают через 40 минут после оседания эритроцитов:

- (+) - выраженная гемагглютинация-тонкая пленка склеившихся эритроцитов на дне пробирки, имеющая вид зонтика,  
(-) – резко очерченный осадок эритроцитов.



- f. Более точным количественным методом учета отдельных вирусных частиц является **метод бляшек**. Культуру клеток заражают вирусом и покрывают тонким слоем агара. После инкубирования посевов в течение суток на поверхности агара появляются просветленные участки определенной формы (бляшки), представляющие собой участки погибших клеток в сплошном монослое культуры клеток. Титр вируса, установленный этим методом, выражают числом бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл.

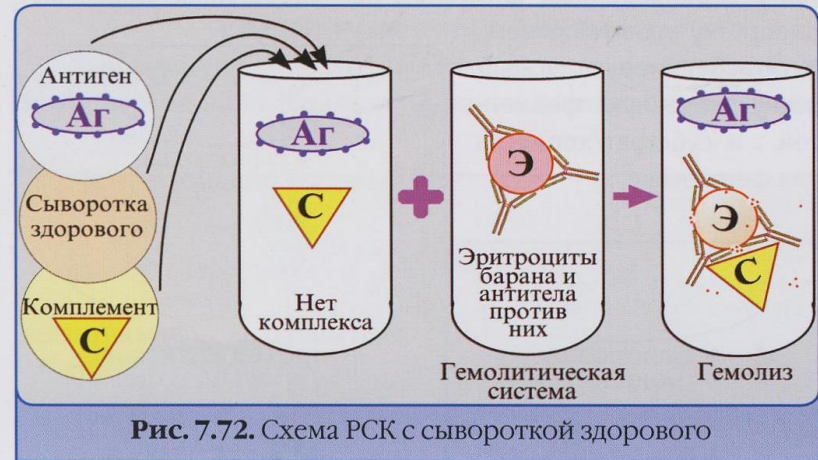


# Методы идентификации вирусов:

## Реакция связывания комплемента

Реакция протекает в две фазы. *Первая фаза* - взаимодействие антигена и антител при обязательном участии комплемента.

*Вторая* - выявление результатов реакции при помощи индикаторной гемолитической системы (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка). Разрушение эритроцитов гемолитической сывороткой происходит только в случае присоединения комплемента к гемолитической системе. Если же комплемент адсорбировался ранее на комплексе антиген-антитело, то гемолиз эритроцитов не



Результат опыта оценивают, отмечая наличие или отсутствие гемолиза во всех пробирках. Реакцию считают *положительной* при полной задержке гемолиза, когда жидкость в пробирке бесцветна и эритроциты оседают на дно, *отрицательной* - при полном лизисе эритроцитов, когда жидкость интенсивно окрашена («лаковая» кровь). Степень задержки гемолиза оценивают в зависимости от интенсивности окраски жидкости и величины осадка эритроцитов на дне (++++, +++, ++, +).

### Основной опыт РСК

Фаза реакции	Ингредиенты, участвующие в реакции	Номера пробирок		
		1, опыт	2, КС	3, КА
1.	1. Исследуемая сыворотка, мл	0,5	0,5	-
	2. Антиген в раб. дозе, мл	0,5	-	0,5
	3. Комплемент в раб. дозе, мл	0,5	0,5	0,5
	4. Изотонический раствор, мл	-	0,5	0,5

Инкубация при 37 С в течение 30 мин

2.	5. Гемолитическая система, мл	1,0	1,0	1,0
----	-------------------------------	-----	-----	-----

Инкубация при 37 С в течение 30 мин

Результат:	
------------	--

Условные обозначения:

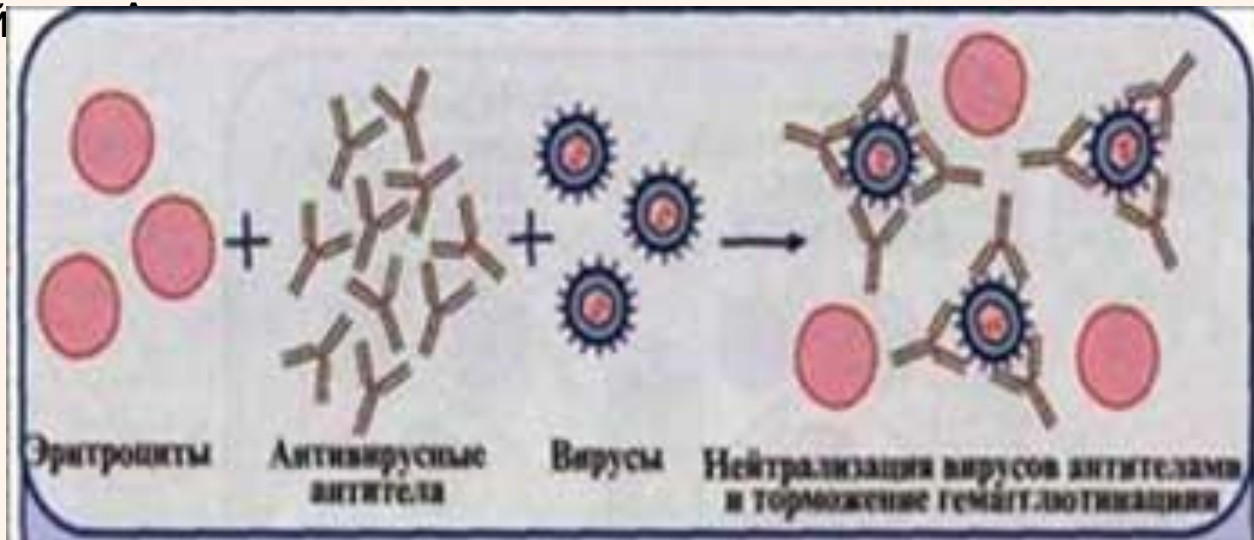
(+) задержка гемолиза,

(-) ге



## Реакция торможения гемагглютинации

Принцип реакции основан на способности АТ связывать различные вирусы и нейтрализовать их, лишая возможности агглютинировать эритроциты. Визуально этот эффект и проявляется в «торможении» гемагглютинации. РТГА применяют при диагностике вирусных инфекций для выявления специфических антигемагглютининов и идентификации различных вирусов по их гемагглютининам, проявляющим свой



## Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации

Под непрямой, или пассивной, агглютинацией понимают реакцию, в которой антитела взаимодействуют с антигенами, предварительно адсорбированными на инертных частицах. В реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) в качестве носителя используют *эритроциты*. Нагруженные антигеном эритроциты склеиваются в присутствии специфических антител к данному антигену и выпадают в осадок. *Постановка.* В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных разведений сыворотки. В предпоследнюю лунку вносят - 0,5 мл заведомо положительной сыворотки и в последнюю 0,5 мл физиологического раствора (контроли). Затем во все лунки добавляют по 0,1 мл разведенного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и помещают в термостат на 2 ч.

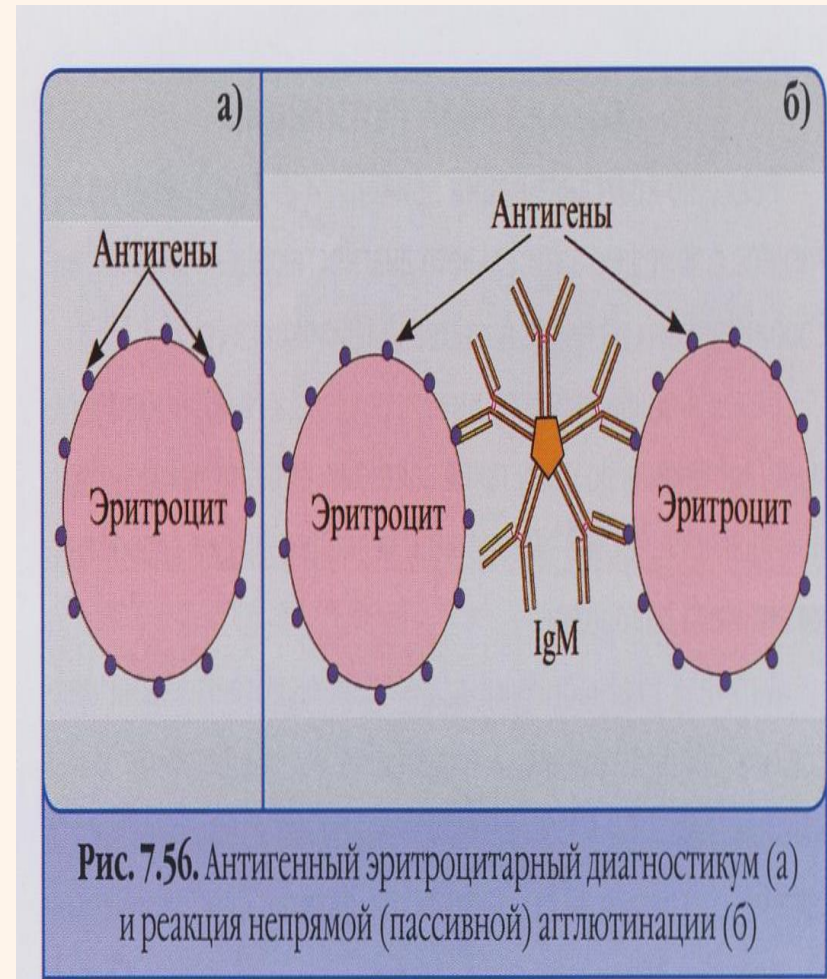


Рис. 7.56. Антигенный эритроцитарный диагностикум (а) и реакция непрямой (пассивной) агглютинации (б)

Учет. В положительном случае эритроциты оседают на дне лунки в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем (перевернутый зонтик), в отрицательном - оседают в виде пуговки или колечка.



# Вирусоскопический метод

## диагностики

Осуществляются при помощи:

1. Электронной микроскопии
2. Люминесцентной микроскопии
3. Световой микроскопии

### Электронная микроскопия

позволяет наблюдать объекты, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа (0,2 мкм). Световые лучи в таких микроскопах заменяют поток электронов, имеющий при определенных условиях длину волны около 0,005 нм, т.е. почти в 100000 раз короче длины волны видимого света.





## Люминесцентная микроскопия

основана на явлении фотолюминесценции. По сравнению с обычными методами обладает рядом преимуществ: возможностью исследования живых микроорганизмов и обнаружения их в исследуемом материале в небольших концентрациях вследствие высокой степени контрастности.

Световая микроскопия позволяет выявить включения вирусов, которые они образуют в ядре или цитоплазме заражённых клеток. Для этого необходимо предварительно окрасить мазок по методу Романовского-Гимзе или серебрением по Морозову.



4. Световой микроскоп

# **Серологическая диагностика**

вирусных инфекций основана на выявлении в крови больного противовирусных антител в серологических реакциях с использованием специфических вирусных антигенов - диагностикумов или специфических тест – систем.

В основе большинства серологических реакций при вирусных инфекциях лежат реакция взаимодействия вирусных антигенов и гомологичных антител в жидкой среде.

**РСК, РТГА, РНГА, РИФ, ИФА, РИА.**

СТАВРОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ



МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ