

ОБЩАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

Лекция № 5

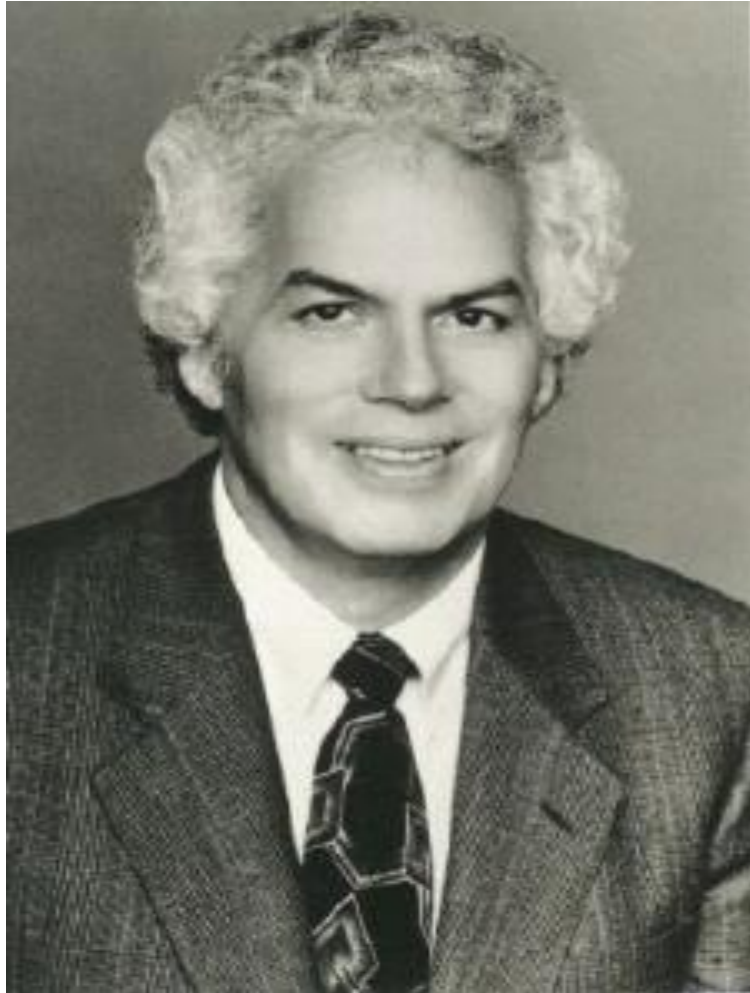
История открытия первых вирусов

1. Вирус табачной мозаики -
Д.И.Ивановский – 1892 г.
2. Бактериофаг - д'Эррель – 1917 г.
3. Прион - Стэнли Прузинер –
1982г.

Д.И.Ивановский (1864 – 1920)



Стэнли Прузинер (1942)



Основные отличия вирусов от других форм жизни

- ⇒ **ОДИН ТИП НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ**
- ⇒ **ОТСУТСТВИЕ**
 - ✓ клеточного строения
 - ✓ белоксинтезирующих систем
 - ✓ энергозапасующих систем
- ⇒ **ВОЗМОЖНОСТЬ ИНТЕГРАЦИИ В КЛЕТОЧНЫЙ ГЕНОМ и синхронной с ним репликации**
- ⇒ **разобщённый (дизъюнктивный) способ размножения (репликации)**

Основные признаки, используемые для классификации вирусов

- ✓ тип нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК)
- ✓ структура генома – количество нитей (цепочек) НК
- ✓ целостность или фрагментированность генома
- ✓ наличие суперкапсида
- ✓ наличие **обратной транскриптазы** (для отнесения к семейству ретровирусов)

Иерархическая система таксонов, применяемых в вирусологии

1. Царство: **Vira**

2. Подцарства: **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

Формы существования вирусов

▣ **внеклеточная** = **ВИРИОН** (структура) :

✓ НК

✓ капсид

✓ [суперкапсид]

. Н-р, вирион имеет форму...

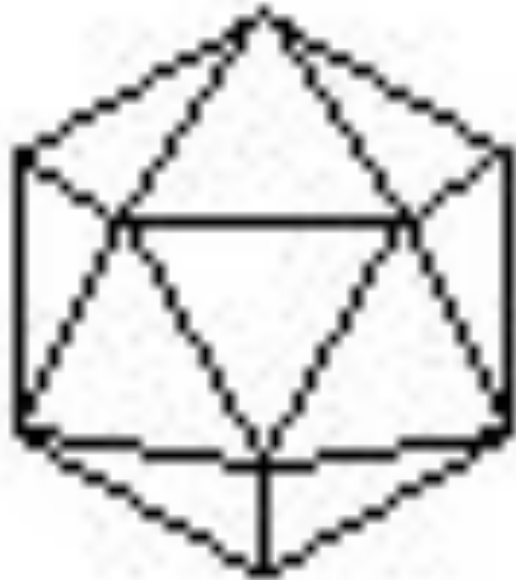
▣ **внутриклеточной** – **ВИРУС**: размножение,
заболевания:

- НК

Н-р, вирус размножается.....

Вирус гриппа.....

Принцип строения вириона



Простой:

**НК+ капсид =
нуклеокапсид**

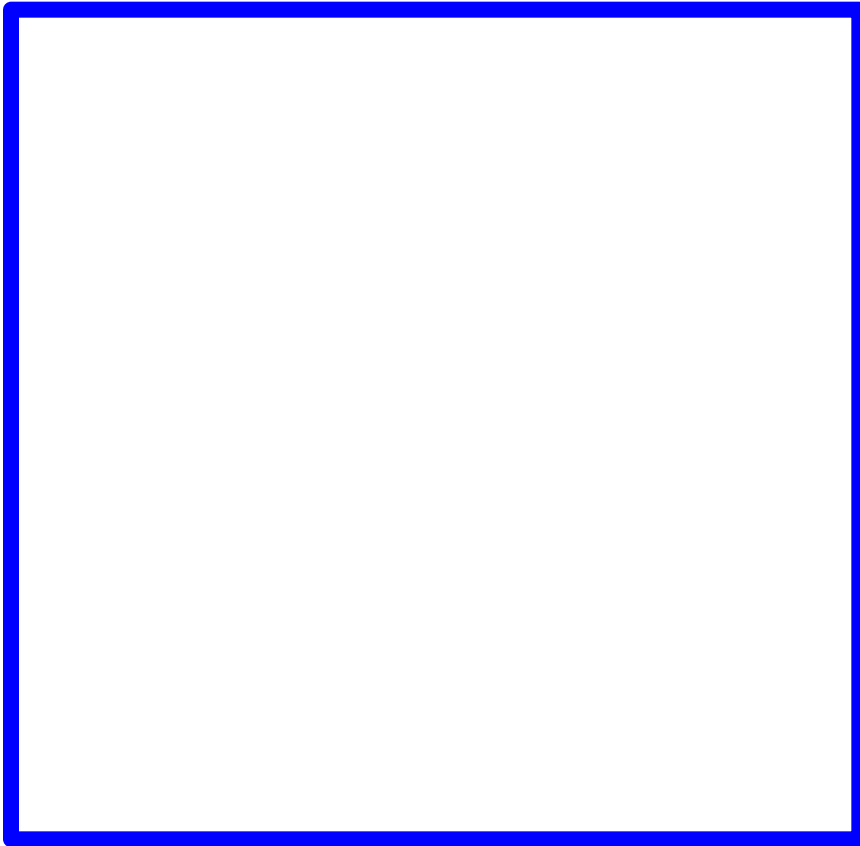


Сложный:

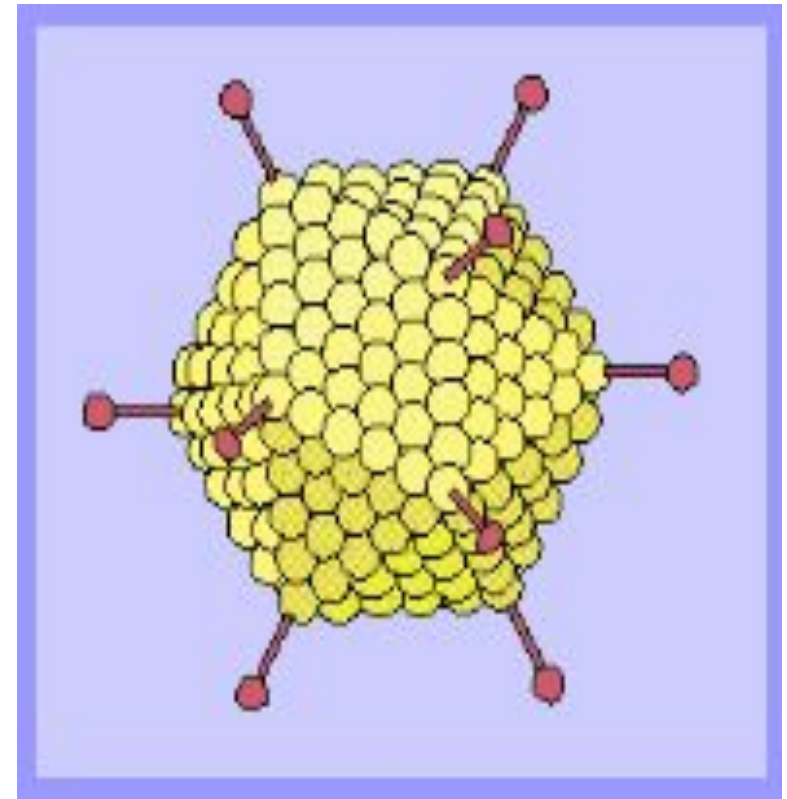
**нуклеокапсид +
суперкапсид**

Типы симметрии капсида

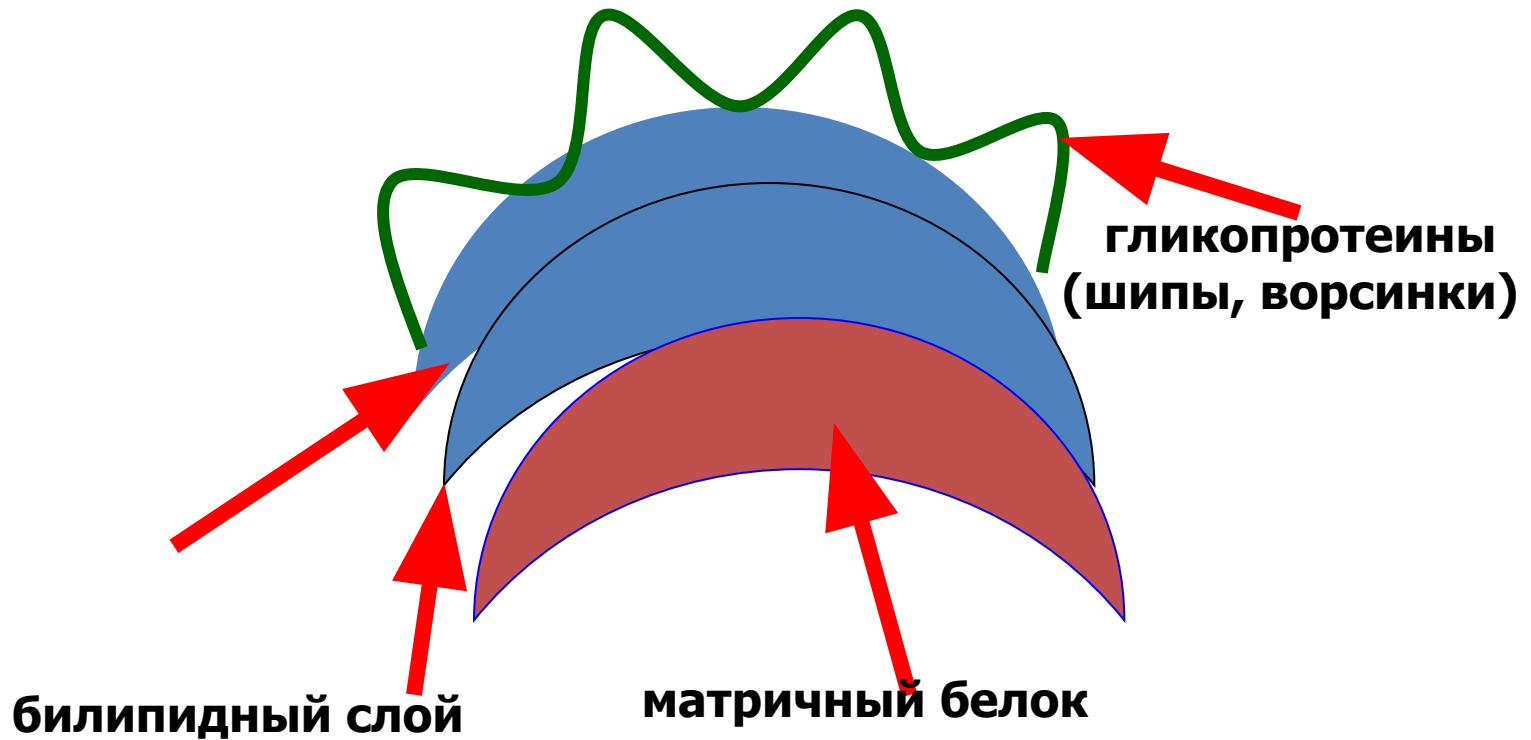
спиральная

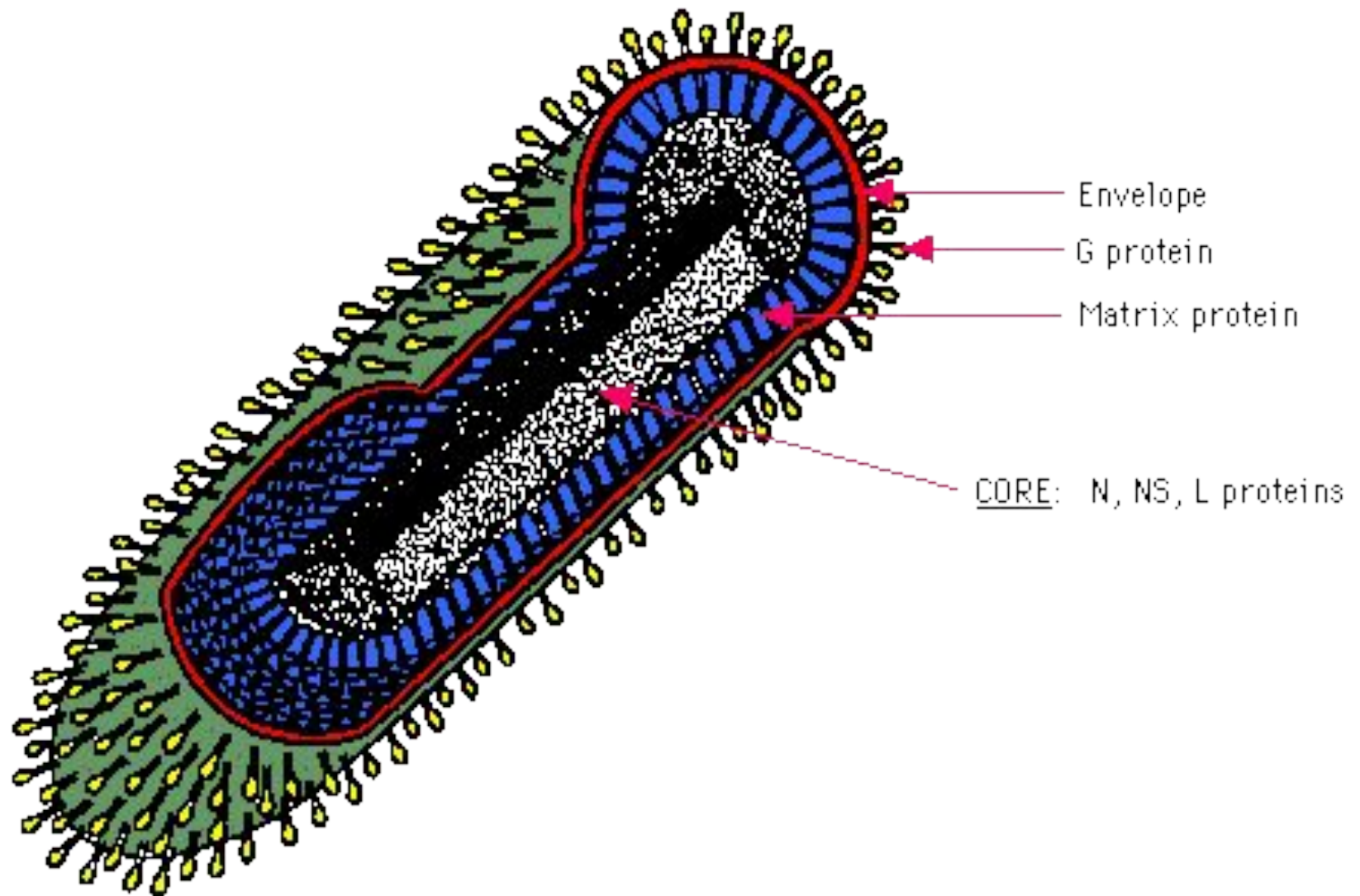


кубическая



Принцип строения суперкапсида





Envelope

G protein

Matrix protein

CORE: N, NS, L proteins

Общая характеристика ДНК вирионов

- **форма:**
 - линейная
 - кольцевая
- **на концах – идентичные повторы:**
 - маркеры вирусной (не клеточной) ДНК
 - способны замыкать ДНК в кольцо
 - репликация
 - транскрипция
 - устойчивость к клеточным эндонуклеазам
 - интеграция в клеточный геном

Общая характеристика РНК вирионов

- форма:
 - линейная
 - кольцевая
- структура:
 - цельная
 - фрагментированная
- информационная функция:
 - +нить (позитивный геном) = иРНК
 - -нить (негативный геном) \neq иРНК

Общая характеристика белков вирионов

1. Структурные

- капсидные
- «внутренние», гистоноподобные (НК ⇒ рибо/дезоксирибонуклеопротеин)

2. Функциональные (ферменты)

- вирионные
- вирусиндуцированные
- вирус может модифицировать клеточные ферменты

Репродукция вирусов

- 3 типа взаимодействия вируса с клеткой:

продуктивный,

абортивный,

интегративный = вирогения,

Репродукция вирусов: продуктивный тип

- образуются новые вирионы, по разному выходящие из клетки:
 - при ее лизисе, т.е. “взрывным” механизмом (безоболочечные вирусы);
 - путем “почкования” через мембраны клетки (оболочечные вирусы),
 - в результате экзоцитоза.

Репродукция вирусов: абортивный тип

характеризуется прерыванием
инфекционного процесса в клетке,
поэтому новые вирионы не образуются;

Репродукция вирусов: **интегративный тип = вирогения**

заключается в интеграции, т.е. встраивании вирусной ДНК в виде провируса в хромосому клетки и их совместном сосуществовании (совместная репликация).

Этапы размножения вирусов в чувствительной клетке

1. прикрепление
2. проникновение и депротейнизация
3. синтез компонентов вируса
 - ранних и поздних белков
 - множественная репликация генома
4. сборка вирионов
5. выход вирионов из клетки

Патологические процессы, вызываемые вирусами

1. инфекционные (микробные) болезни = вирусные инфекции,
2. опухоли

Способы культивирования вирусов

- куриный эмбрион
- культура клеток
- организм лабораторного животного



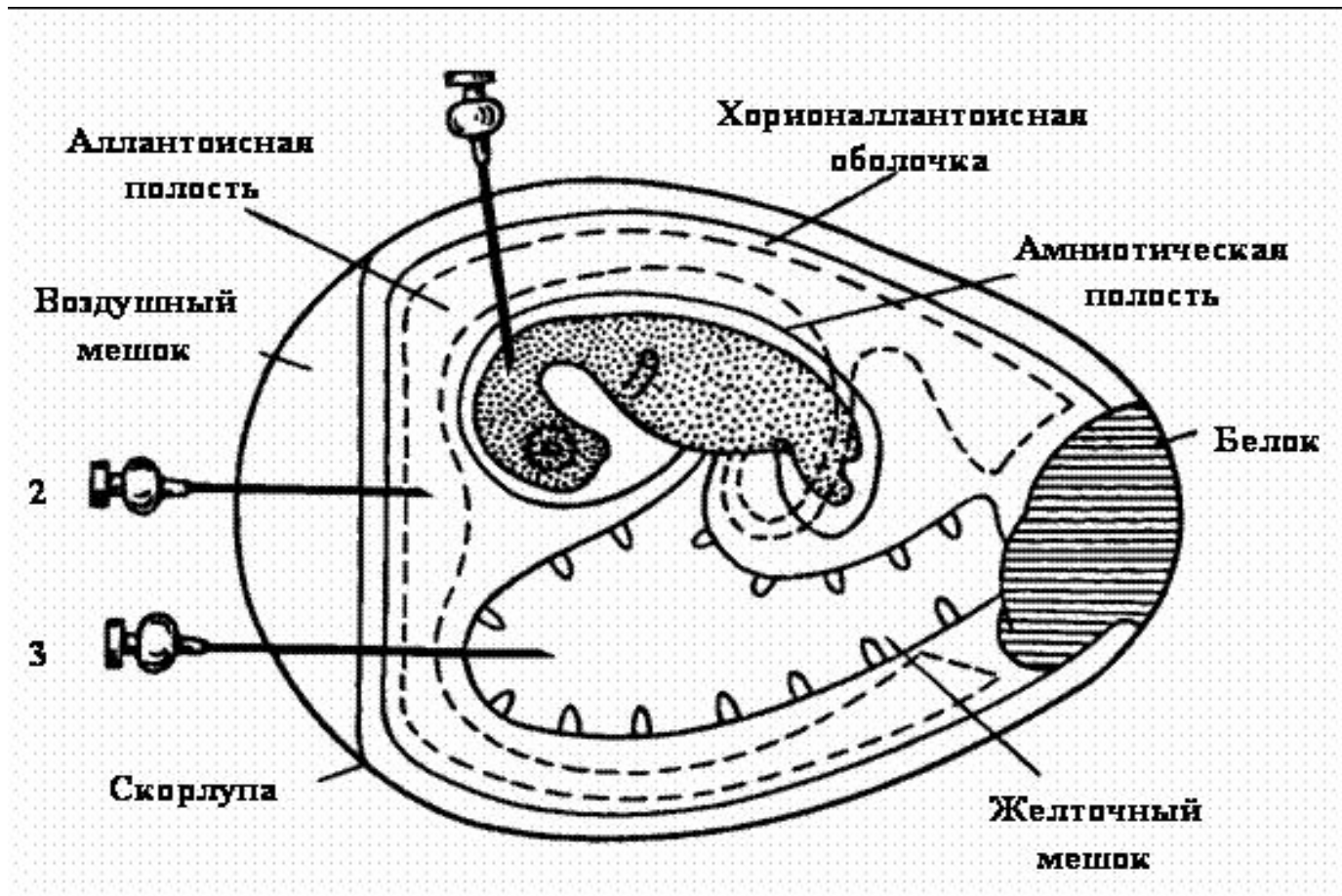
обнаружение наличия вируса
(индикация)



определение типа вируса
(идентификация)

Использование для вирусологического метода куриного эмбриона

5-7-дневные, реже – 10-11-дневные



Основные способы заражения куриных эмбрионов

- на хорион-аллантоисную оболочку
- в хорион-аллантоисную 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.

Использование культур клеток

Чаще – перевиваемые монослойные

- индикация:
 - цитопатическое действие вирусов – любое изменение клеток монослоя, включая бляшкообразование и цветную пробу
- идентификация:
 - РН (в т.ч. РТГАдс)
 - РСК
 - РИФ

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

= **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.

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.

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.

Условия культивирования клеток:

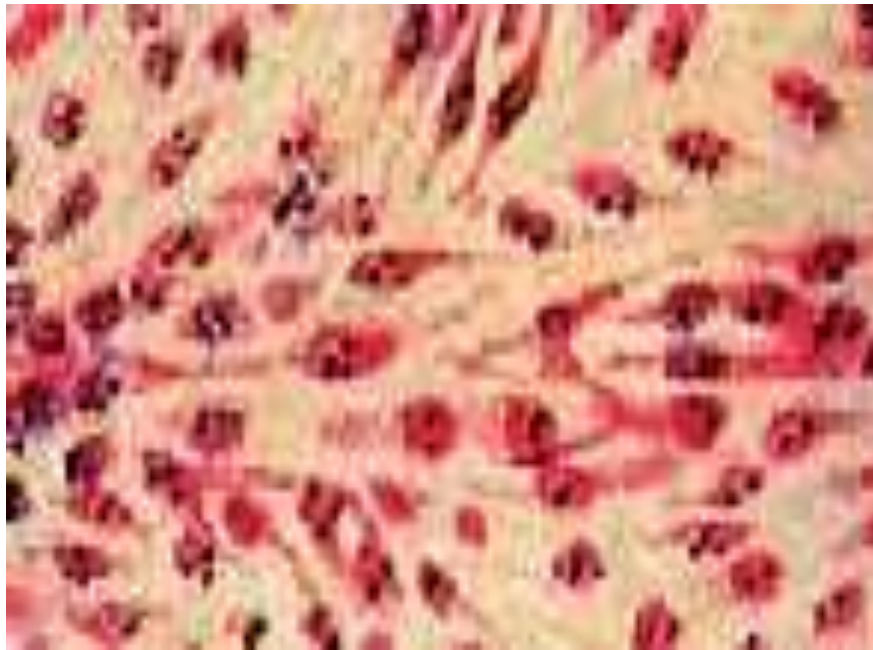
- Питательные среды сложного **состава** (среда 199, Игла), содержат источники энергии (глюкозу), минеральные вещества, аминокислоты, витамины, сыворотку крови, факторы роста.
- Клетки чувствительны к изменениям **pH** – для контроля pH добавляют индикатор и буферные растворы.
- Соблюдение правил **асептики**
- 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



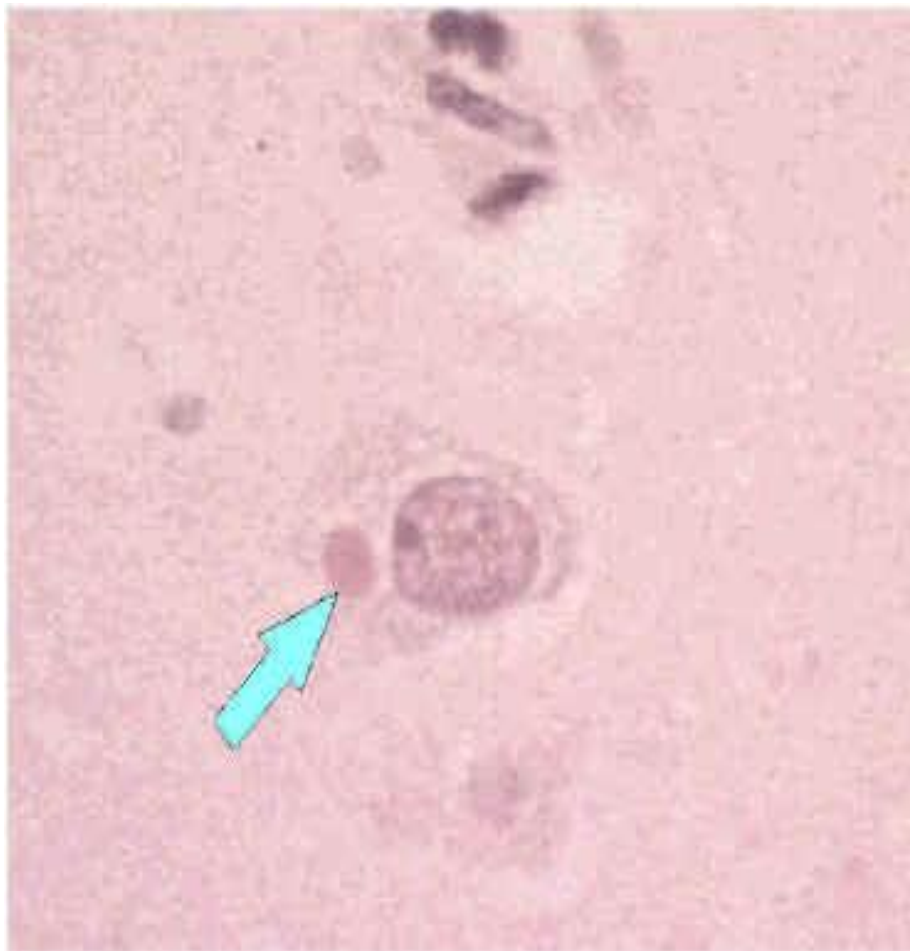
Виды ЦПД

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

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



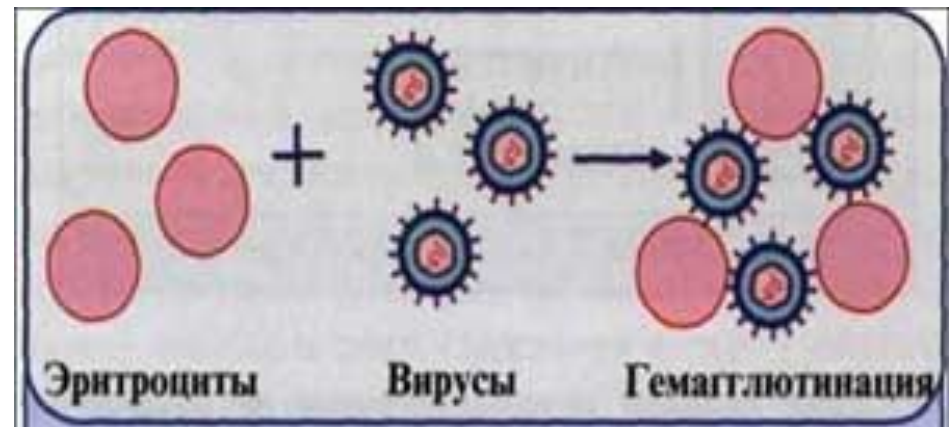
Бляшки, или “негативные”

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.

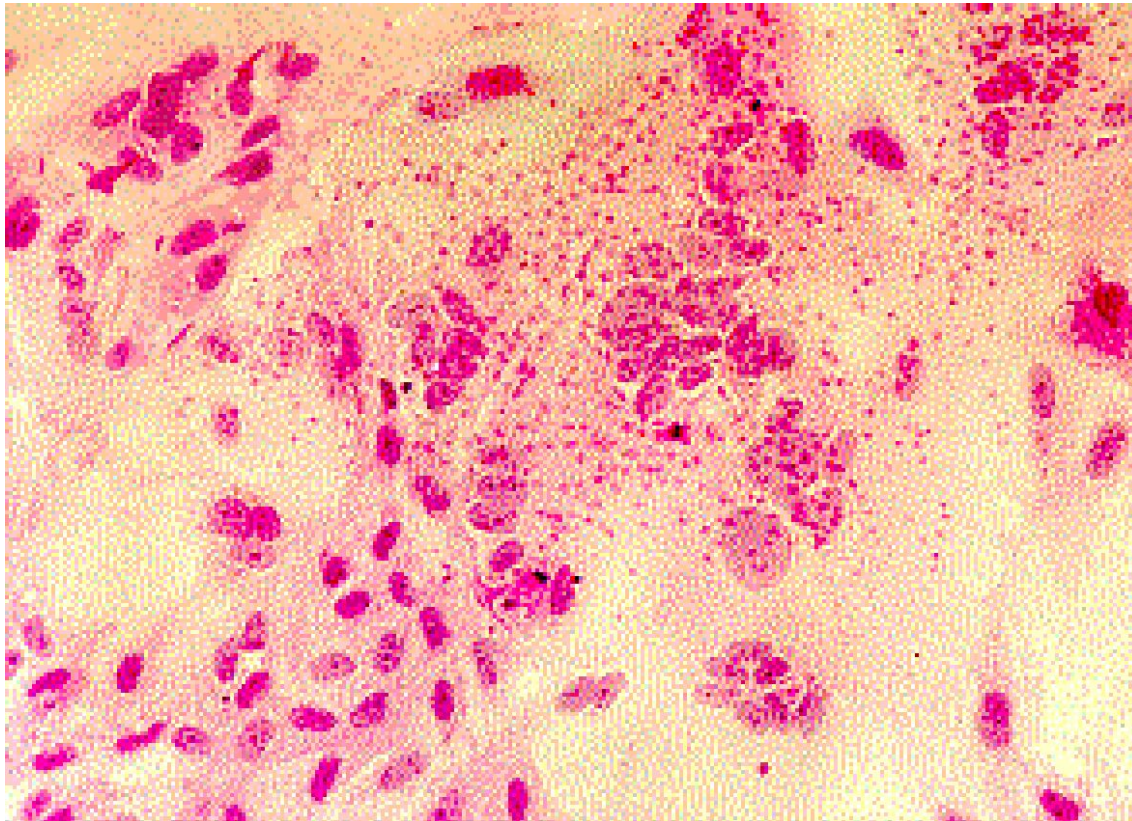
Реакция гемагглютинации (РГА)

- 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)

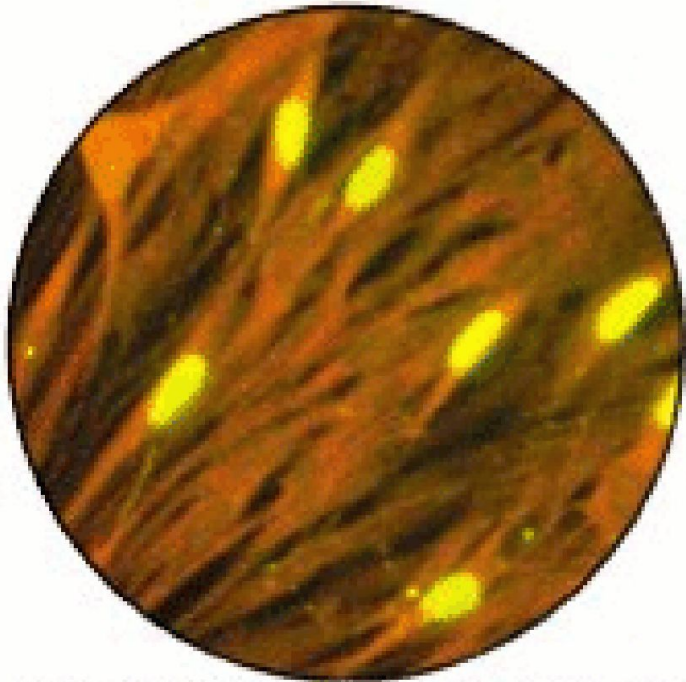


Fig. 2, CMV centrifugation culture fixed and stained 16 hrs after inoculation showing viral proteins in nuclei of infected human fibroblast cells

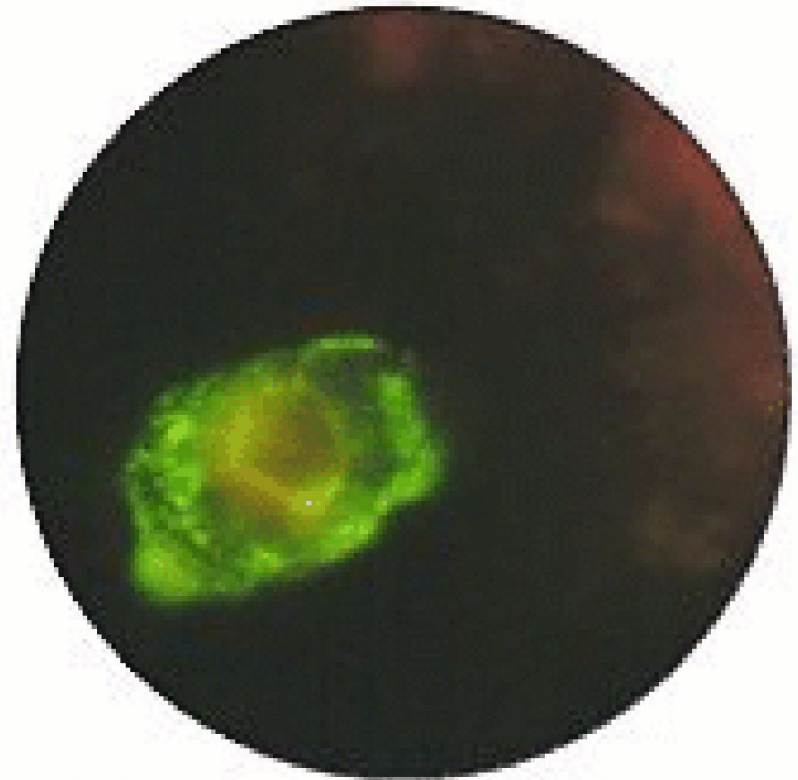


Fig. 3, HSV-infected epithelial cell from skin lesion (DFA)

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}),
инфекционная форма (PrP^{s}) .

Прионы

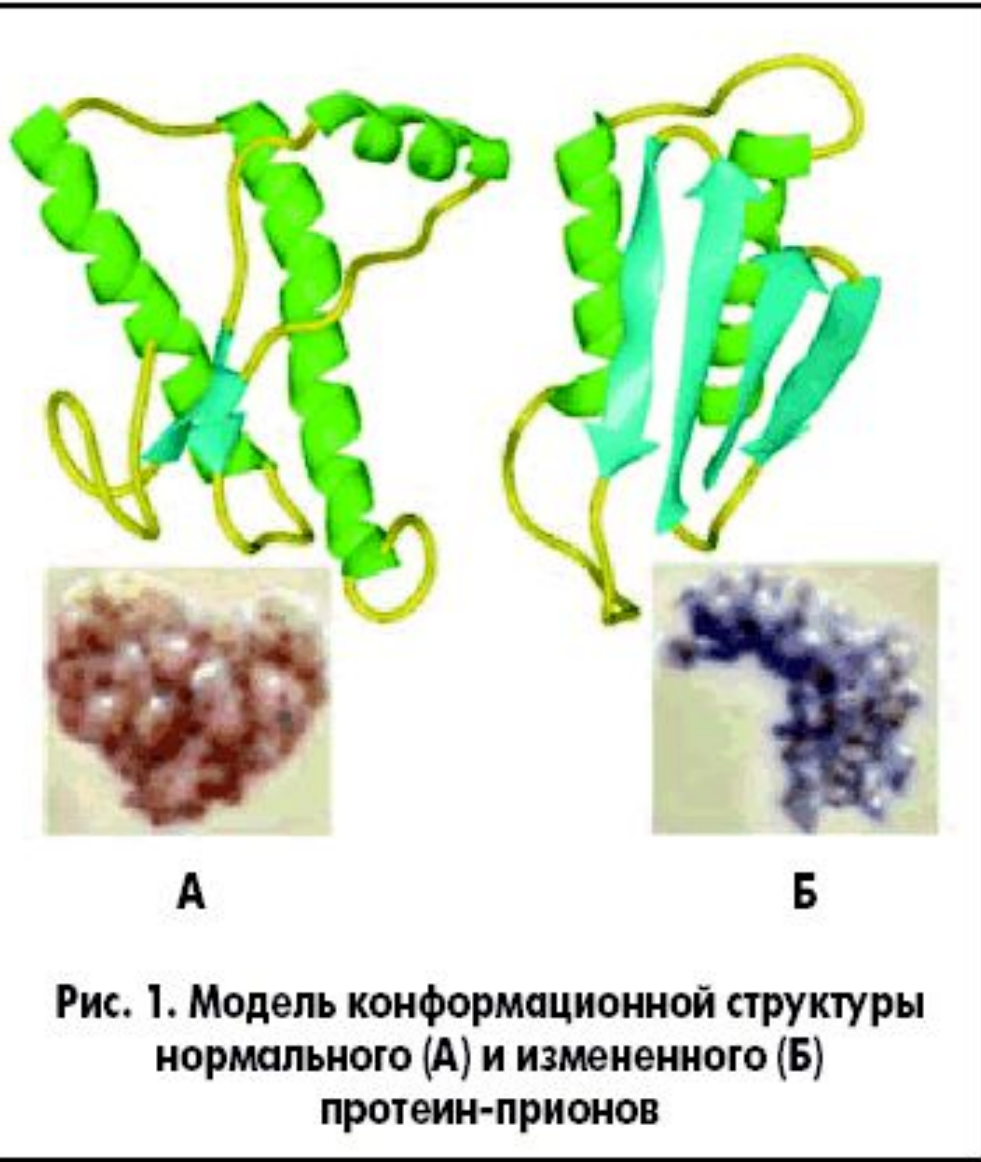
- нормальная клеточная форма (PrP^c) - обнаруживается в организме всех млекопитающих.
- Ген, кодирующий этот белок, расположен **в коротком плече 20 хромосомы**.
- PrP^c участвует в передаче нервных импульсов, в поддержании циркадных ритмов клетки,

Прионы

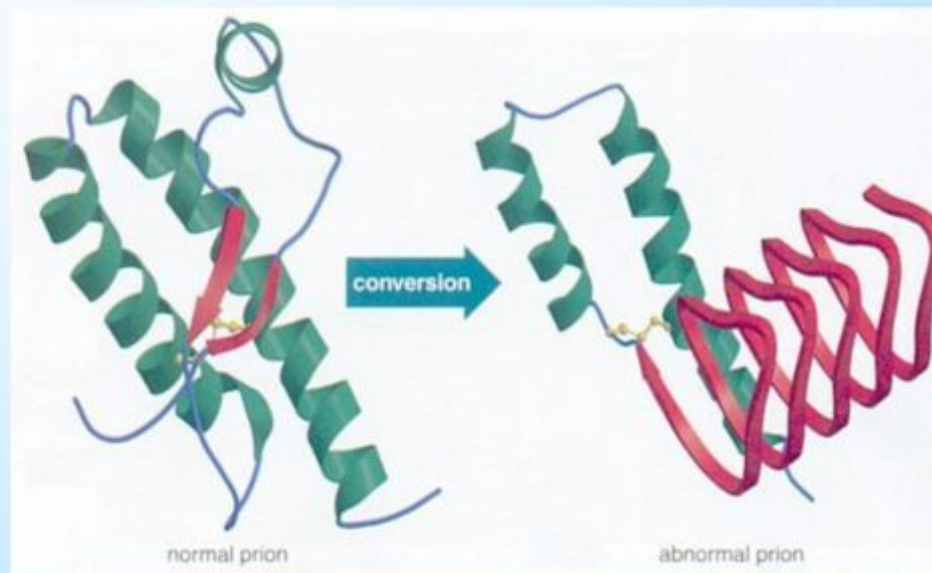
инфекционная форма (PrP^S) –

характеризуется:

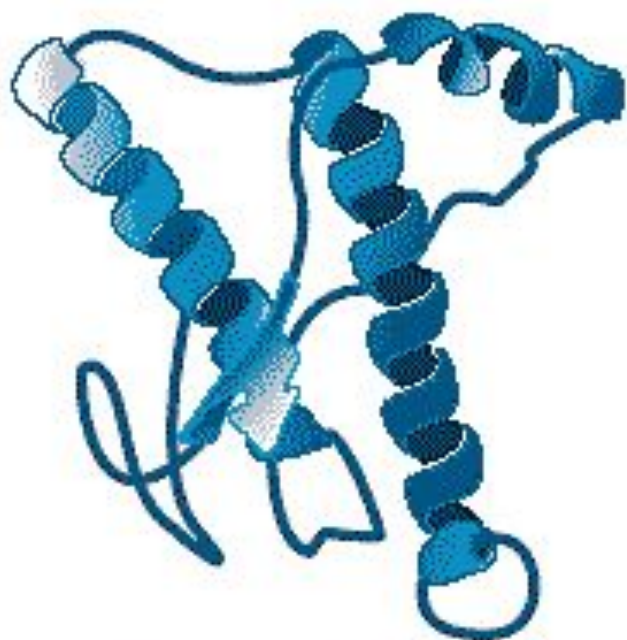
- измененной вторичной и третичной структурой молекулы,
- и высокой устойчивостью к нагреванию, ультрафиолетовому свету, проникающей радиации и переваривающему действию протеаз.



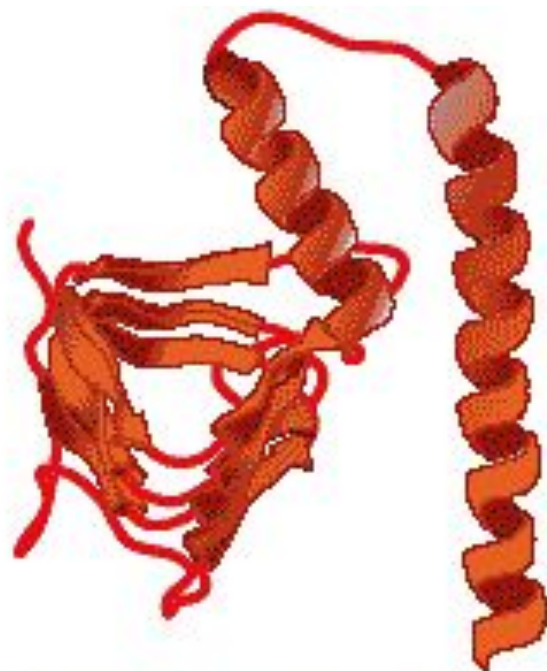
Переход приона из нормальной формы в аномальную



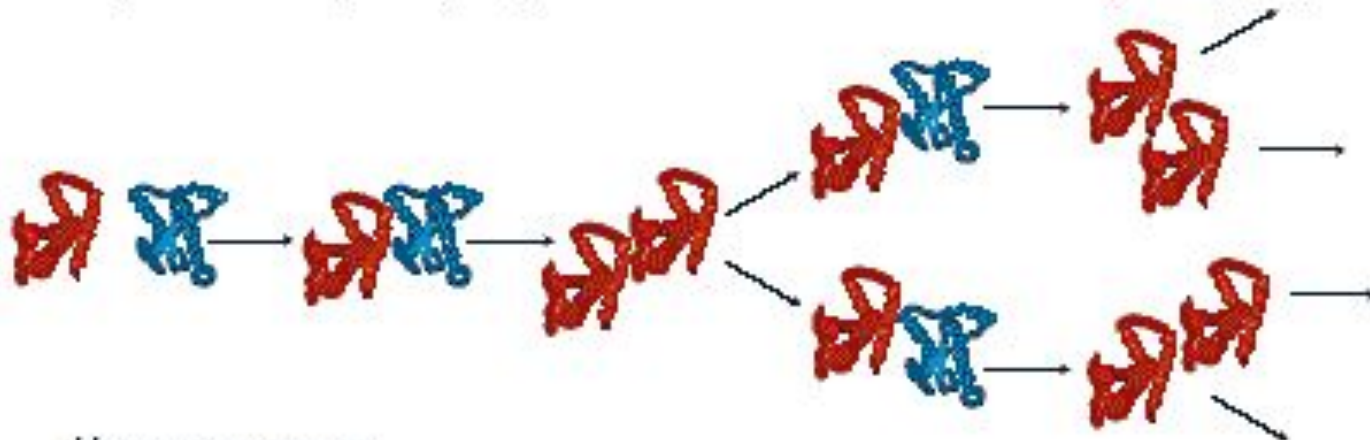
Прионы не структурированы и сильно обогащены аминокислотными остатками глутаматом и аспарагином. Это свойство позволяет прионным доменам полимеризоваться с образованием амилоидных фибрилл



Нормальный прион (PrP^C)



Патогенный прион (PrP^{Sc})



Цепная реакция