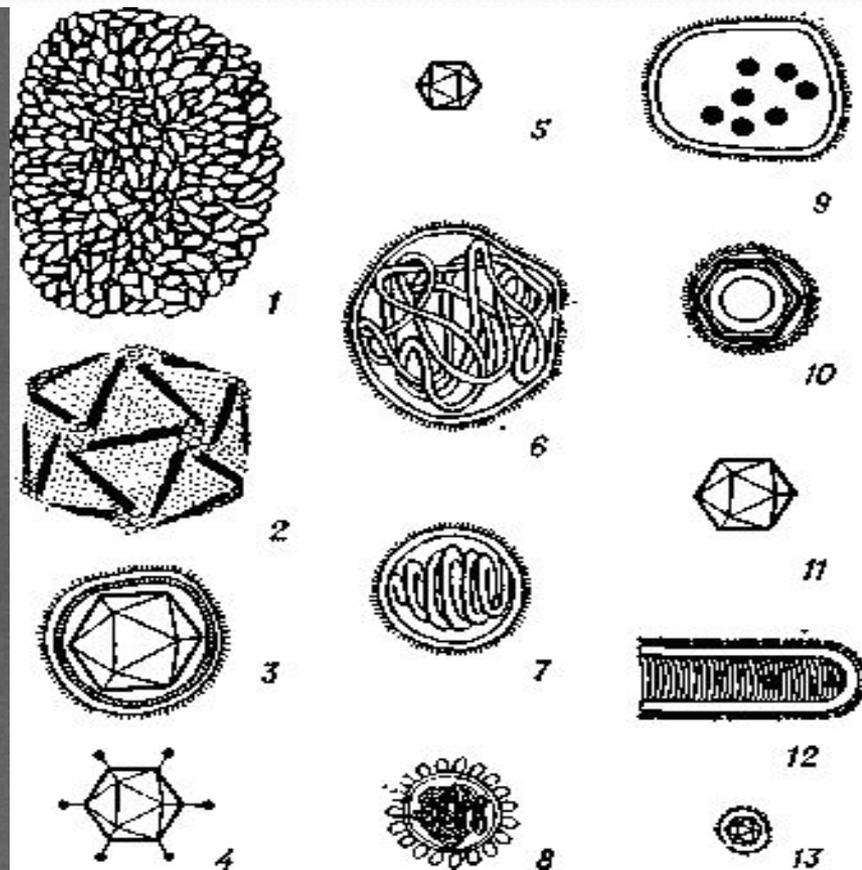
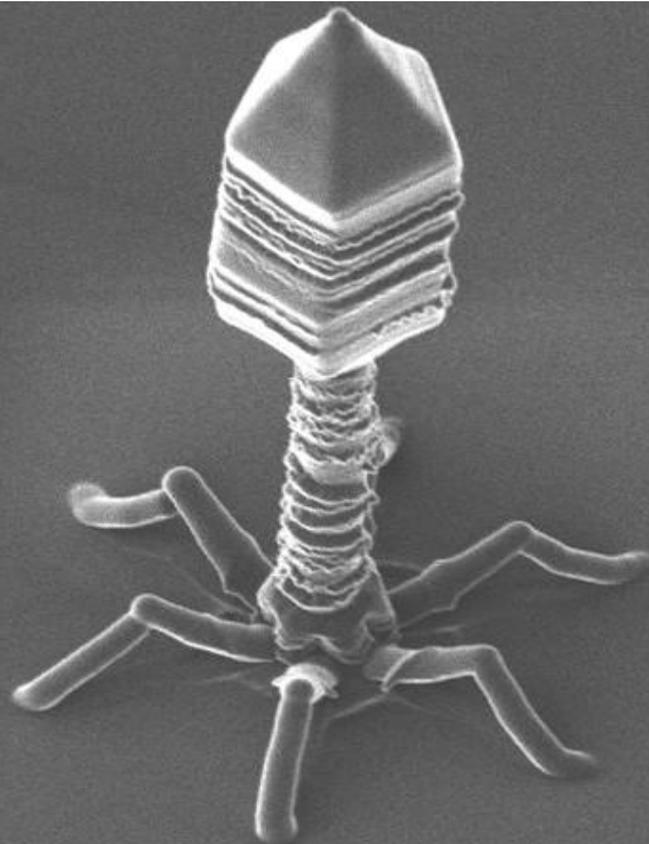


ОБЩАЯ ВИРУСОЛОГИЯ. БАКТЕРИОФАГИЯ.

Для лечебного и
педиатрического факультета

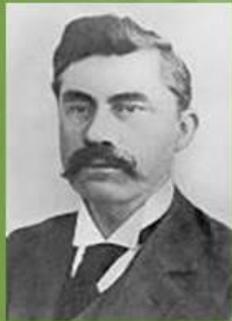
К.м.н. доцент кафедры микробиологии Соковнина С.В.

● Вирусология - это наука, изучающая мельчайшие организмы – вирусы.



История открытия вирусов

(лат. *virus* — «яд»)



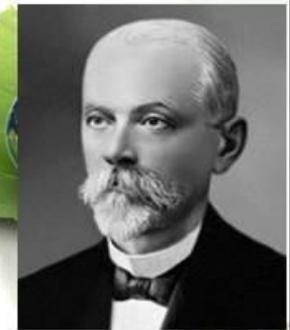
**Мартин Виллем
Бейеринк**

1898 г.

Независимо от Д.И. Ивановского описал вирус табачной мозаики

1892 г.

При исследовании мозаичной болезни табака, выявил вирус табачной мозаики (метод фильтрации).

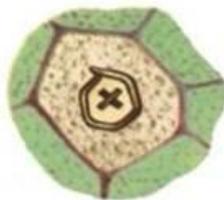


**Дмитрий
Иосифович
Ивановский**

Вирус табачной мозаики и его схема строения



лист табака, пораженный мозаичной болезнью (светлые участки)

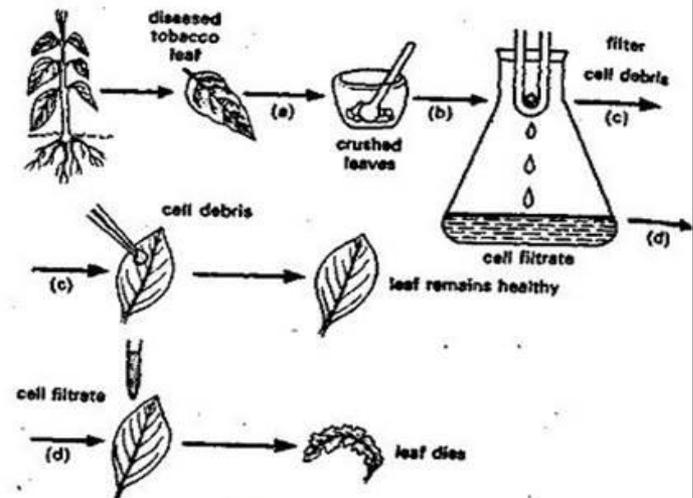


кристалл вируса в клетке листа



РНК, свернутая в спираль
оболочка из белковых молекул

строение вируса



ФОРМЫ СУЩЕСТВОВАНИЯ ВИРУСОВ

ВИРИОН



ВИРУС



ПРОВИРУС

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ (ПОКОЯЩАЯСЯ) ФОРМА (СТАДИЯ) ВИРУСОВ, ВЫПОЛНЯЮЩАЯ ФУНКЦИЮ ПЕРЕНОСА ГЕНОМА ИЗ ОДНОЙ КЛЕТКИ В ДРУГУЮ

РЕПРОДУКТИВНАЯ ФОРМА (ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СТАДИЯ РАЗВИТИЯ)

ФОРМА ИНТЕГРАЦИИ ГЕНОМА ВИРУСА С ГЕНОМОМ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА, РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСА НЕ ПРОИСХОДИТ

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.

КЛАССИФИКАЦИИ ВИРУСОВ

**1. ПО ТИПУ НУКЛЕИНОВОЙ
КИСЛОТЫ**

ДНК-ВИРУСЫ

РНК-ВИРУСЫ

**2. ПО ОСОБЕННОСТЯМ
НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

**ПОЗИТИВНАЯ ИЛИ
НЕГАТИВНАЯ РНК**

**ОДИНАРНАЯ ИЛИ
ДВОЙНАЯ ДНК**

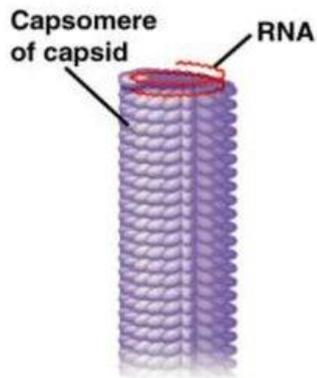
**ЛИНЕЙНАЯ, КРУГОВАЯ
ИЛИ СЕГМЕНТАРНАЯ**

3. ПО НАЛИЧИЮ ОБОЛОЧЕК

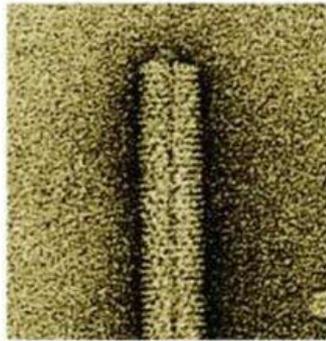
**ПРОСТЫЕ ВИРУСЫ
(КАПСИД)**

**СЛОЖНЫЕ ВИРУСЫ
(КАПСИД+СУПЕРКАПСИД)**

Морфология вирусов

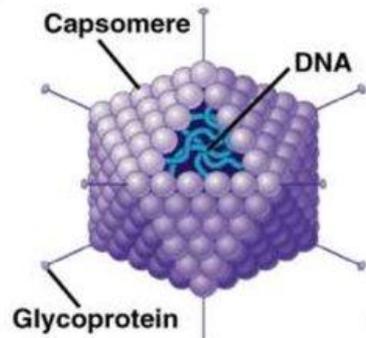


18 × 250 nm

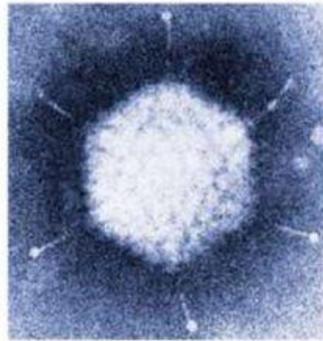


20 nm

(a) Tobacco mosaic virus

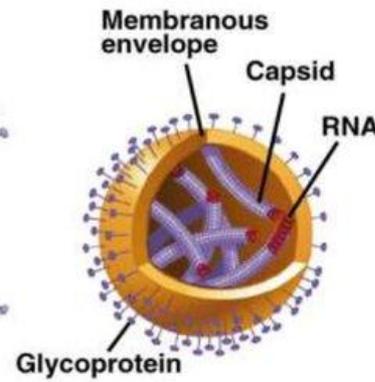


70–90 nm (diameter)

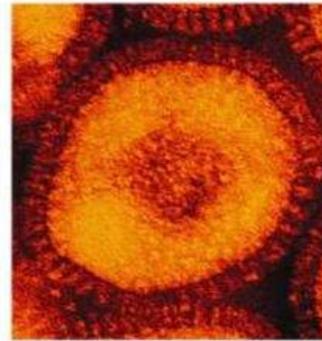


50 nm

(b) Adenoviruses

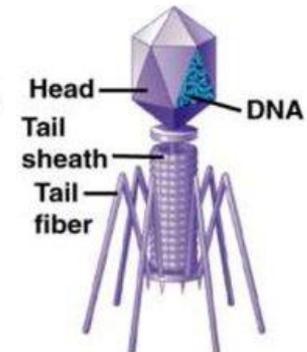


80–200 nm (diameter)



50 nm

(c) Influenza viruses



80 × 225 nm



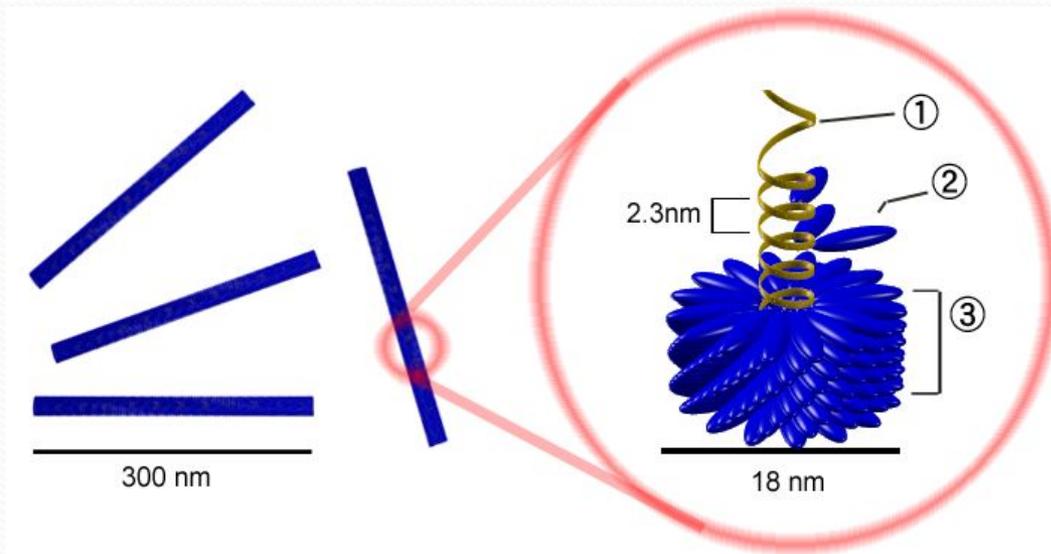
50 nm

(d) Bacteriophage T4

- Вирусы представляют собой геометрически правильное образование, состоящее из **центральной части – НК**, несущей генетическую информацию, и окружающей её **белковой оболочки – капсида** (лат. «Capsa» – коробка, футляр), состоящей из определённым образом уложенных однотипных молекул – **капсомеров**.

Тип симметрии

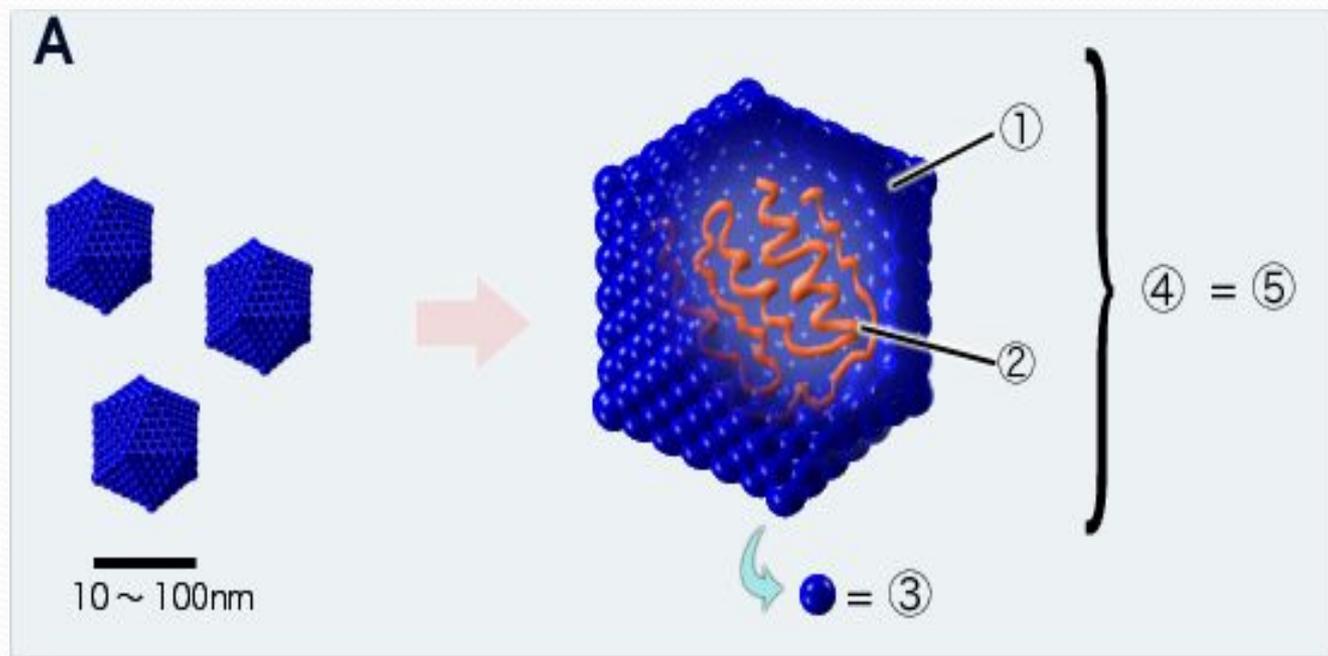
Спиральный тип симметрии: капсомеры располагаются по спирали. Такие вирусы крупные, полиморфны. Имеют *палочковидную* и *пулевидную* форму.



Спиральный тип симметрии:

1. Нуклеиновая кислота
2. Капсомеры
3. Нуклеокапсид

Кубический тип симметрии: капсомеры образуют многогранник, ограниченный определенным количеством равносторонних треугольников. Могут быть в виде тетраэдра (4), октаэдра (8), икосаэдра (20). Такие вирусы имеют *сферическую форму*.

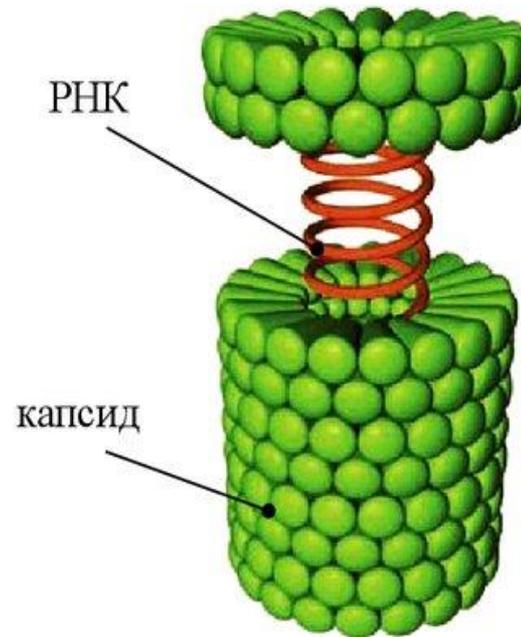
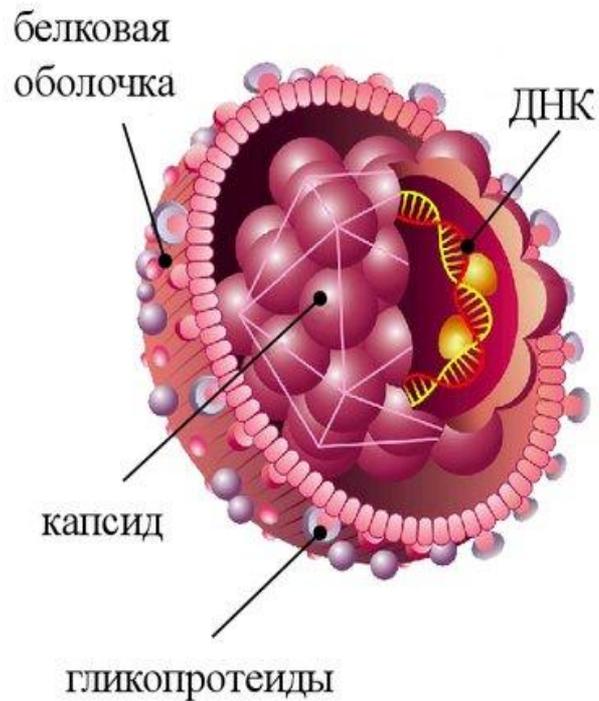


Кубический тип симметрии:
1. Капсомеры
2. Нуклеиновая кислота

- Сложные вирусы имеют дополнительные оболочки – *пеплосы*, покрывающие нуклеокапсид. Пеплосы состоят из *пепломеров*, представленных белками, липидами. Эта оболочка является липопротеидной и называется *суперкапсидом*. У РНК-вирусов в её составе липиды, у ДНК-вирусов – фосфолипиды.

Строение вирусов

Сложные вирусы имеют дополнительную оболочку



ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ВИРУСОВ

**ГЕНОМ: РНК ИЛИ ДНК
(ОТ ДЕСЯТКОВ ДО НЕСКОЛЬКИХ СОТЕН ГЕНОВ)**

БЕЛКИ:

- **СТРУКТУРНЫЕ (ВХОДЯТ В СОСТАВ
ОБОЛОЧЕК ВИРИОНА),**
- **ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ
(УЧАСТВУЮТ В РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА)**

**ЛИПИДЫ И УГЛЕВОДЫ: ОПРЕДЕЛЯЮТСЯ
КЛЕТКОЙ-ХОЗЯИНОМ,
НО МОДИФИЦИРУЮТСЯ СТРУКТУРНЫМИ
БЕЛКАМИ ВИРУСА**

Вирусные белки

- **Структурные:**
 - ~капсидные белки;
 - ~суперкапсидные белки;
 - ~матриксные белки;
 - ~сердцевидные белки.
- **Неструктурные белки.**

Особенность вирусных белков

Субъединицы активно взаимодействуют между собой и способны к самосборке, в результате которой из НК и белка формируются новые полноценные вирионы.

Функции структурных белков

- Защита НК от внешних воздействий
- Взаимодействие с мембраной клетки при адсорбции вириона
- Взаимодействие с НК при сборке в капсид.

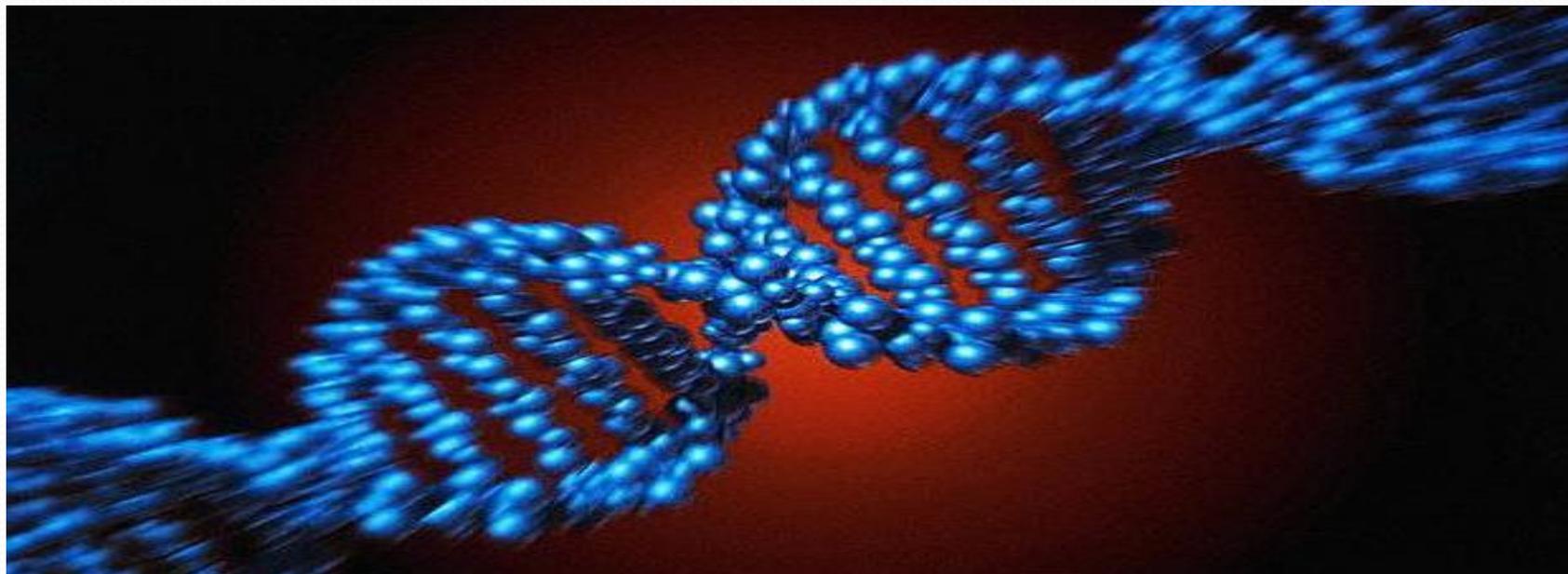
Функции неструктурных белков

- Регуляторы экспрессии вирусного генома;
Ингибиторы клеточного биосинтеза и разрушения клеток;
- Являются вирусными ферментами:
 - ~ДНК-зависимая РНК-полимераза
 - ~РНК-зависимая РНК-полимераза
 - ~нейроминидаза, гемагглютинин и др.

Нуклеиновые кислоты

- НК – носители наследственности, определяющие инфекционные свойства.
- Представляют собой длинные нити, построенные из нуклеотидов.
- Каждый нуклеотид состоит из:
 - ~рибозы или дезоксирибозы;
 - ~фосфорной кислоты;
 - ~пуринового и пиримидинового основания.

- У ДНК-вирусов НК в виде двойной спирали, линейная или кольцевая.
- У РНК-вирусов НК однонитевая (+) или (-) – нитевая, линейная, фрагментированная или нефрагментированная. Фрагментированный геном содержит большой объём информации.



- В **(+)-нитевой** или **(+)-геномной РНК** объединены генетическая и информационная функции – т.е., она участвует в воспроизводстве НК и белка, выполняя **функции иРНК и мРНК**. Поэтому даже в изолированном виде является инфекционной и обозначается как позитивный геном.
- **(-)-нитевая РНК** не может программировать синтез белков, т.е., **не имеет информационной функции (иРНК)**. В изолированном виде не проявляет инфекционности и обозначается, как негативный геном.

Классификация вирусов

- В вирусологии используют следующие таксономические категории: **семейство** (название оканчивается на *viridae*), **подсемейство** (название оканчивается на *virinae*), **род** (название оканчивается на *virus*).
- Однако названия родов и особенно подсемейств сформулированы не для всех вирусов. Вид вируса биномиального названия, как у бактерий, не получил.

В основу классификации вирусов положены следующие категории:

- **тип нуклеиновой кислоты** (ДНК или РНК), ее структура, **количество нитей** (одна или две), **особенности воспроизводства вирусного генома**;
- **размер и морфология вирионов, количество капсомеров**
- **тип симметрии; наличие суперкапсида;**
- **чувствительность к эфиру и дезоксихолату;**
- **место размножения в клетке;**
- **антигенные свойства и пр.**

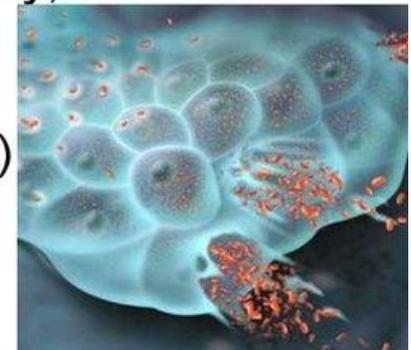
Взаимодействие вирионов с клеткой

- **Продуктивный или цитоцидный тип:** образуется новое поколение вирионов.
- **Абортивный тип:** прерывание инфекционного процесса на какой-то стадии, и новые вирионы не формируются.
- **Интегративный тип, или вирогения:** ДНК вируса встраивается в хромосому клетки в виде провируса.

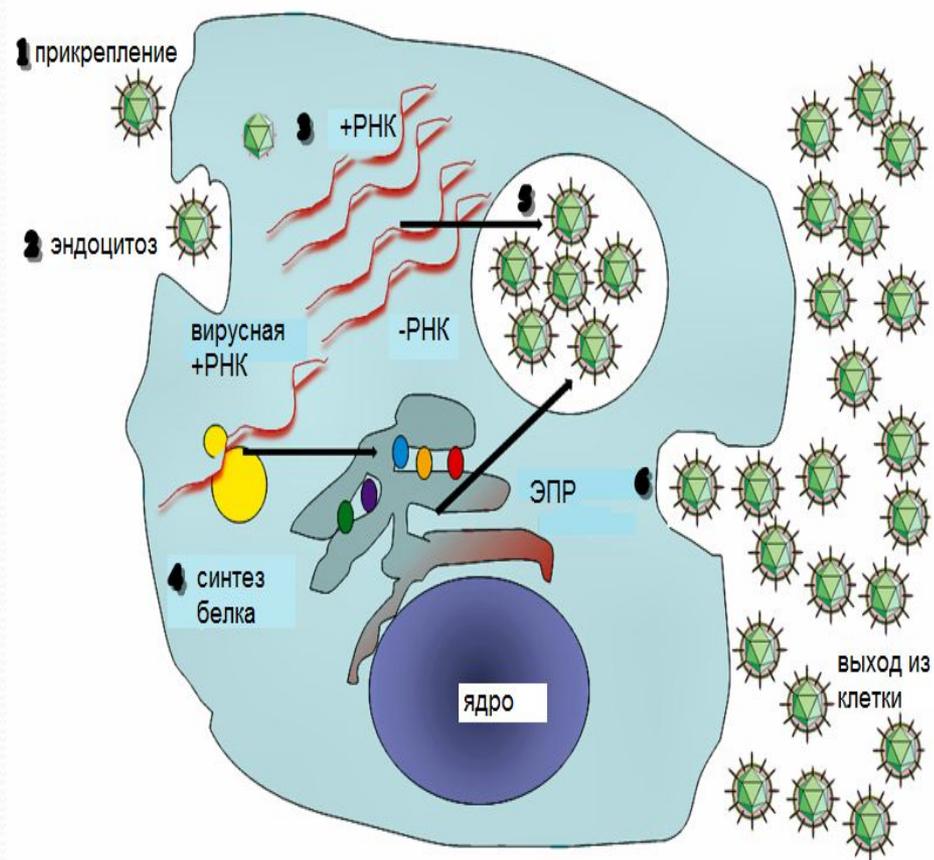
Продуктивный тип

взаимодействия вируса с клеткой

- осуществляется в результате размножения, т.е. **репродукции** вируса (от англ. *reproduce* – воспроизводить). Чаще взаимодействие «клетка-вирус» имеет **литический** характер и заканчивается гибелью клетки.
- **Гибель клетки** обуславливают следующие факторы:
 - раннее подавление синтеза клеточных белков;
 - накопление токсических и повреждающих вирусных компонентов;
 - повреждение клеточных лизосом с высвобождением их содержимого в цитоплазму;
 - образование синцития;
 - апоптоз;
 - иммуноопосредованная гибель клетки (*in vivo*)



Этапы продуктивного типа взаимодействия:



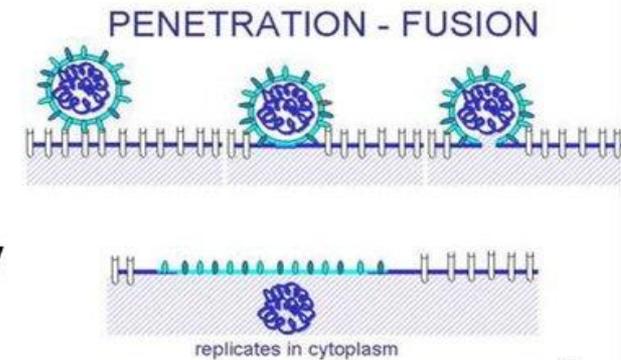
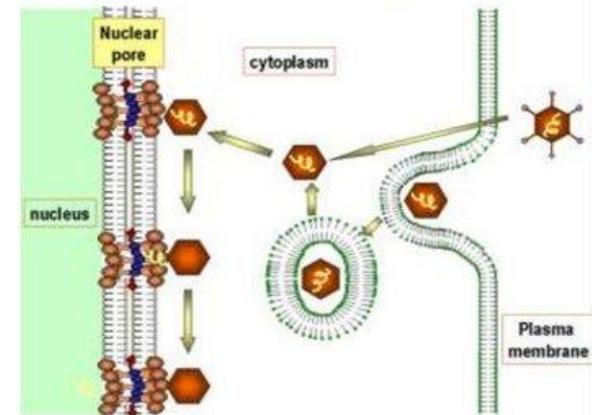
- **Адсорбция вириона;**
- **Проникновение**
- **в клетку;**
- **Дезинтеграция;**
- **Синтез компонентов вириона;**
- **Композиция (сборка вирионов);**
- **Высвобождение дочерних вирионов.**

Адсорбция вируса на клетке

- Взаимодействие поверхностных белков вируса со специфическими **рецепторами** чувствительных клеток. **Тропизм** вируса (греч. *tropos* – поворот, направление) – способность избирательно поражать определенные клетки.
- Процесс адсорбции не требует энергетических затрат и протекает в две фазы:
 - **ионное притяжение** между вирусом и клеткой, взаимодействие носит неспецифический характер;
 - **физическое прикрепление** вирусной частицы к соответствующему поверхностному рецептору (структурная гомология, комплементарность специфических рецепторов).
- **Множественность заражения:** клетка содержит около 500 000 рецепторов → на клетке могут сорбироваться множество вирионов.

Проникновение вируса в клетку

- **Виропексис** (рецепторный эндоцитоз).
- **Слияние** оболочки вируса с клеточной мембраной (при наличии белка слияния).
- Сочетание этих двух механизмов.
- Вирусы, лишенные суперкапсида, проникают в клетку непосредственно через цитоплазматическую мембрану (**трансмембранная пенетрация**).



Особенности репродукции вирусов

- +РНК вирусы: трансляция → репликация → сборка вириона.
- Остальные вирусы: транскрипция → трансляция → репликация генома → сборка вириона.
- РНК вирусы (кроме вирусов гриппа и ретровирусов) репродуцируются в цитоплазме.
- ДНК вирусы репродуцируются в ядре (транскрипция и репликация), и в цитоплазме (трансляция вирусных белков, их процессинг и сборка вирионов). Вирус оспы размножается в цитоплазме (собственные системы транскрипции).
- Нуклеокапсидные белки вирусов синтезируются на свободных полирибосомах, а суперкапсидные белки – на рибосомах, связанных с мембранами.
- Белки некоторых вирусов подвергаются протеолитическому процессингу и гликозилированию.

Репродукция вирусов

- ДНК – вирусы:

ДНК – иРНК – Р – Б

- (+) – РНК:

РНК (иРНК) – Б

- (-) – РНК:

РНК – иРНК – Р – Б

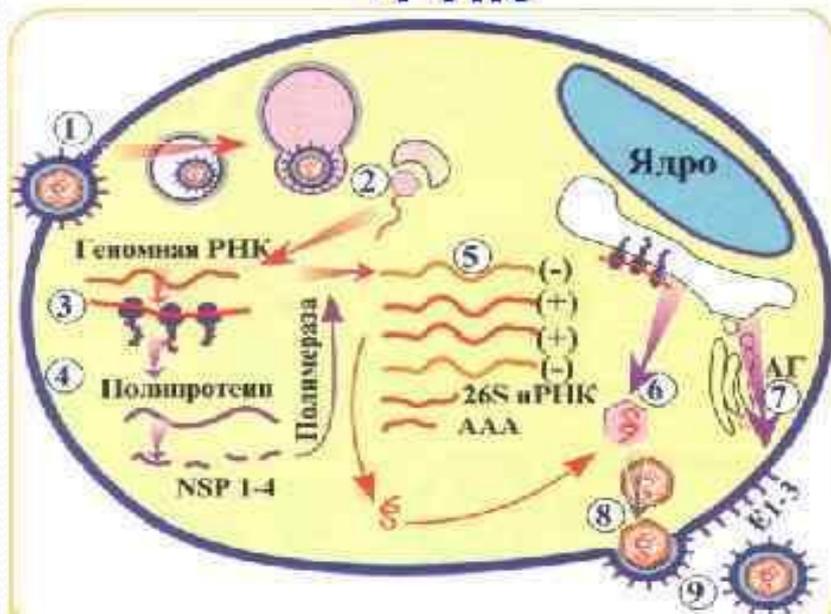
- РНК – вирусы с обратной транскриптазой:

РНК – ДНК – иРНК – Р – Б

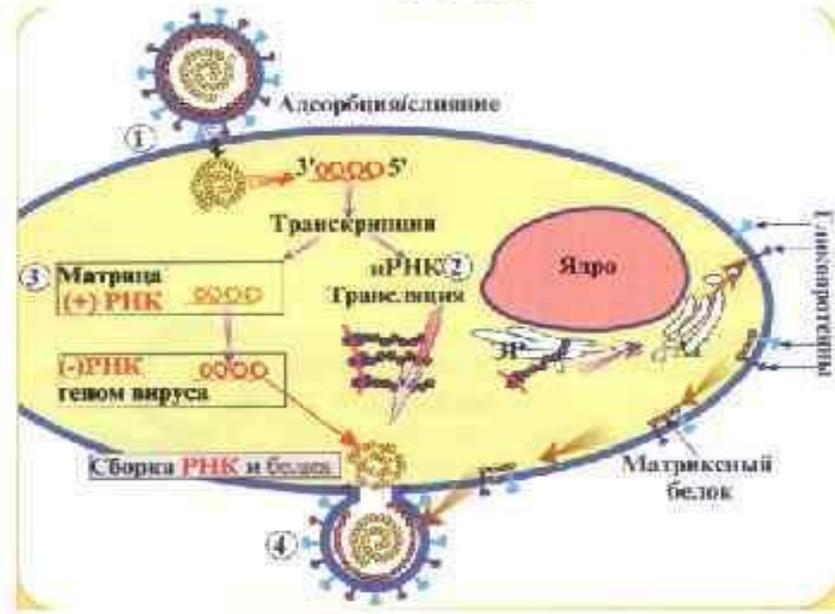
Репликация вирусных геномов

Однонитевая РНК: $vРНК \rightarrow кРНК \rightarrow vРНК$, катализируется репликазой.

+РНК

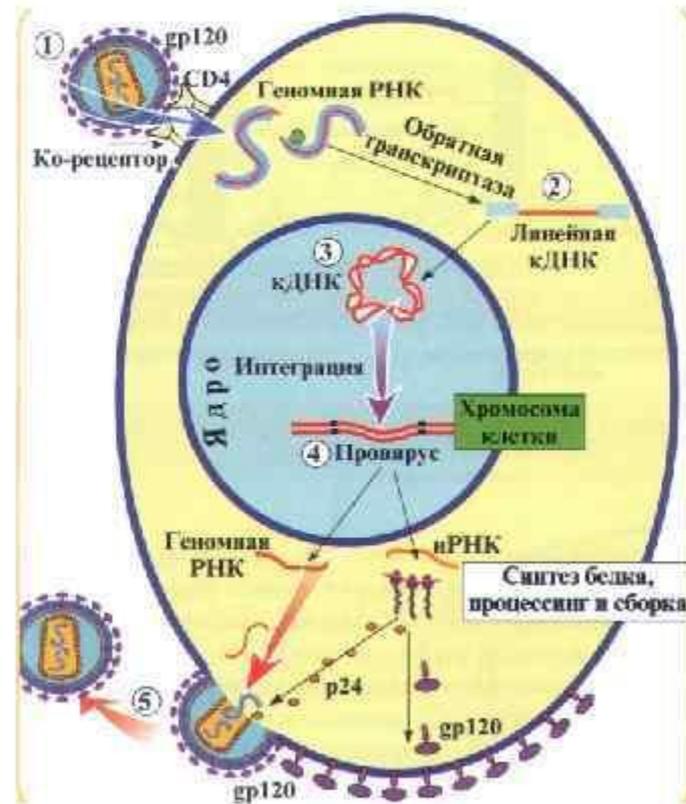


-РНК



Репликация вирусных геномов

Однонитевая РНК ретровирусов:
РНК → ДНК → РНК,
катализируется обратной транскриптазой.

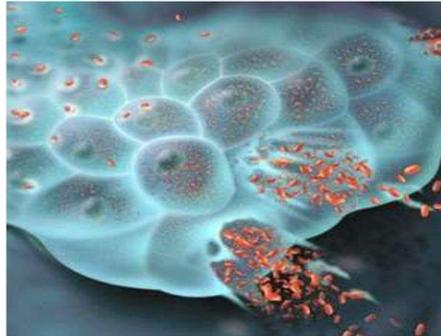


Выход вирусов из клетки

- **1. взрывной путь:** клетка погибает и вирусы выходят наружу = **простеустроенные вирусы,**
- **2. почкование, экзоцитоз:** = **сложноустроенные вирусы:**
 - = нуклеокапсид транспортируется к клеточным мембранам,
 - = в области контакта мембрана выпячивается → почка,
 - = почка отделяется, клетка остается живой,
- = при формировании в цитоплазме:
 - вирус проходит через плазматическую мембрану (парамиксовирусы, тогавирусы),
 - мембраны ЭПС;
- = при формировании в ядре – ядерную мембрану, затем цитоплазматические везикулы и наружу.

Выход вирионов из клетки

- **Взрывной:** из погибающей клетки одновременно выходит большое количество вирионов.

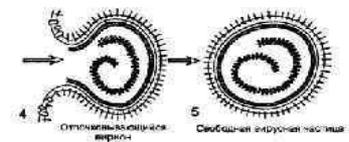
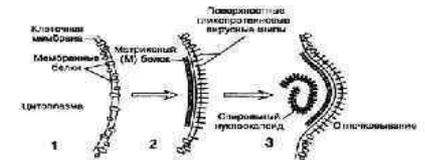
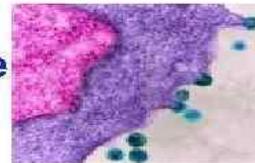


- **Простые вирусы.**

Выход вирионов из клетки

- **Почкование:** нуклеокапсид транспортируется к мембране, в которую встроены вирусные белки → выпячивание → отделение почки от клетки.

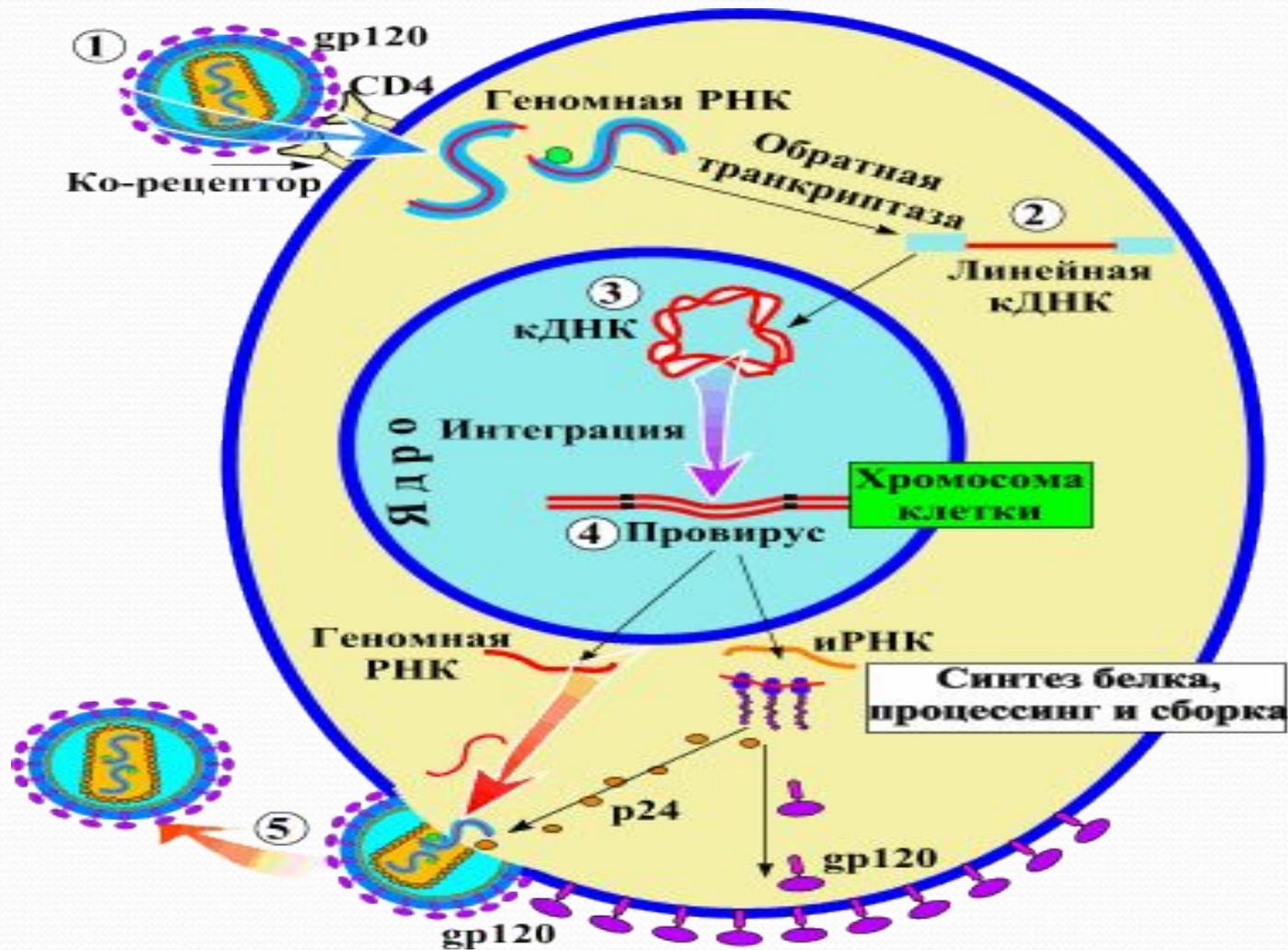
- **Сложные вирусы.**

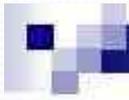


Интегративный тип взаимодействия вируса с клеткой

- **Вирогения** – интеграция (встраивание) нуклеиновой кислоты вируса в геном клетки, репликация и функционирование вирусного генома как составной части генома клетки. Состояние вирогении наследуется
- Для интеграции с клеточным геномом необходимо возникновение кольцевой формы двунитевой ДНК вируса.
- Встроенная в состав хромосомы клетки вирусная ДНК называется **провирусом**.

Интегративный тип взаимодействия





Интегративный тип взаимодействия вируса с клеткой

- **Латентные инфекции** с периодическими реактивациями
- **Вирусная трансформация** клеток → развитие опухолей, аутоиммунных и хронических заболеваний
- **Персистенция** (от лат. *persisto* – постоянно пребывать, оставаться) вирусов в организме → персистентные вирусные инфекции

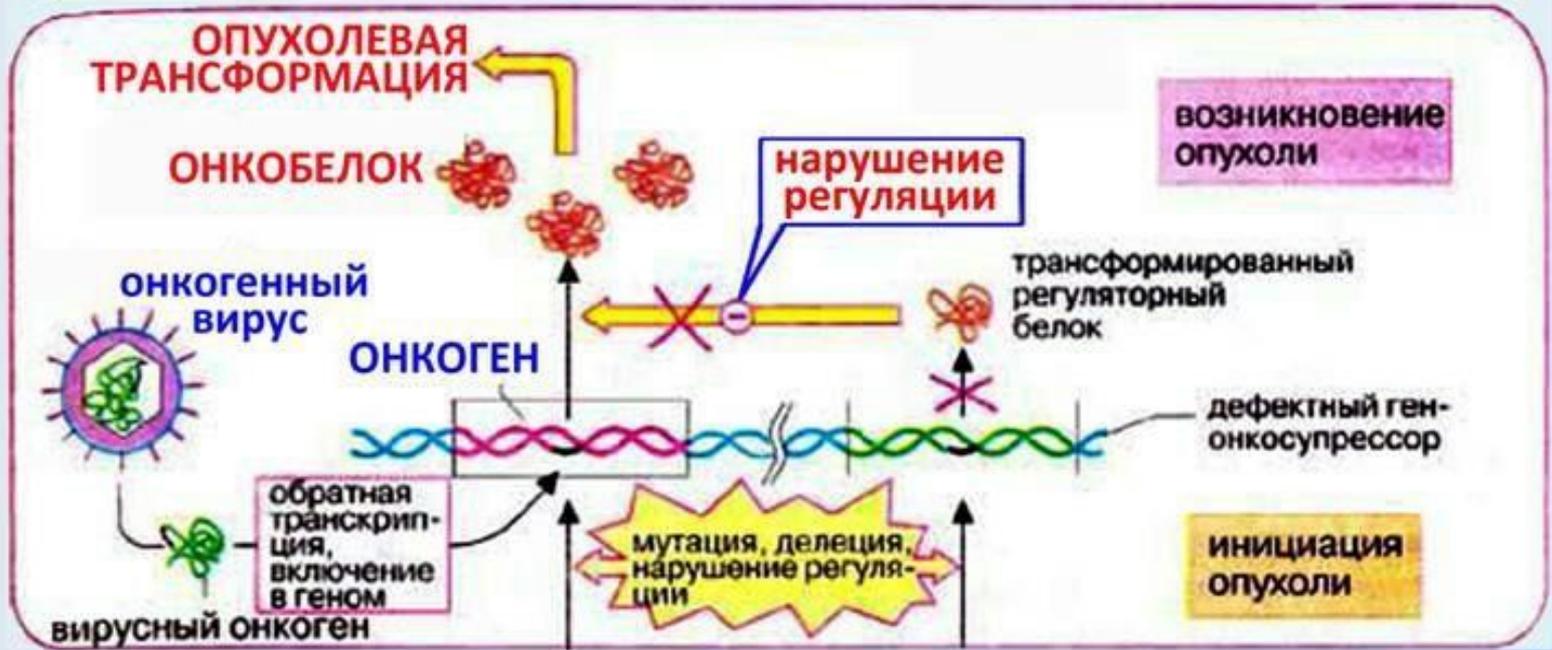
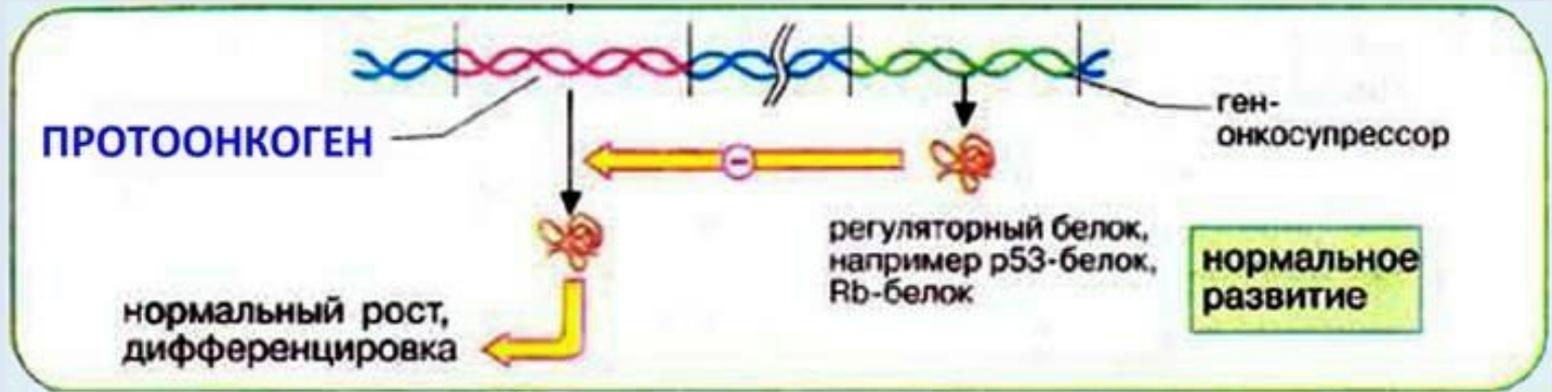
Онкогенные вирусы

- Обладают основным общим свойством — способностью трансформировать нормальные клетки в опухолевые.
- При проникновении вируса в клетку он не разрушает ее, а изменяет (трансформирует) в сторону беспрепятственного размножения, делая клетку злокачественной для организма.
- Онкогенными свойствами обладают различные представители как ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов.

Вирусный канцерогенез

- **ДНК**-содержащие вирусы (*герпеса, аденовирус, ветряной оспы*) полностью или частично встраиваются в геном хозяина и экспрессируют свои гены
- **РНК**-содержащие вирусы содержат *ревертазу* и онкогены, ответственные за опух трансформацию (вирус саркомы Рауса – *src-онкоген, встраивание в геном клеток приводит к их трансформации*).

ОНКОГЕНЫ



Абортивный тип взаимодействия вируса с клеткой

= прерывание инфекционного процесса в клетке на одном из этапов,

= новые вирионы не образуются;

- **Происходит когда:**

1. **чувствительные клетки заражаются дефектными вирусами или дефектными вирионами**

Дефектные вирусы = самостоятельные виды, но для репродукции нуждаются в вирусе-помощнике.

(Н-р, вирус гепатита Д и гепатита В).

Дефектные вирионы – лишены части генетического материала и накапливаются в популяции при множественном заражении клеток.

Абортивный тип взаимодействия вируса с клеткой

- **2. стандартным вирусом заражаются генетически резистентные к нему клетки:**

Механизм резистентности может быть связан:

- с отсутствием специфических рецепторов для вирусов на мембране клеток,
- с неспособностью данных клеток инициировать трансляцию вирусной иРНК,
- с отсутствием специфических протеаз или нуклеаз, необходимых для синтеза вирусных молекул.

- **3. стандартным вирусом заражаются чувствительные клетки в неразрешающих (непермиссивных) условиях:**

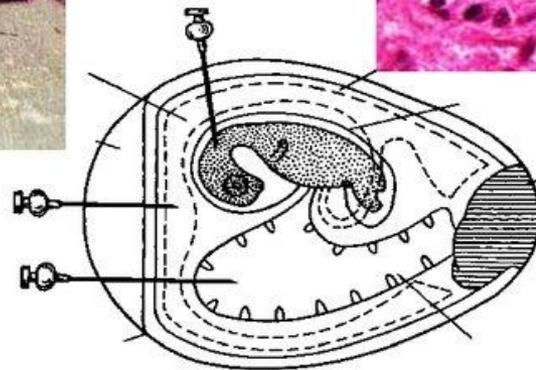
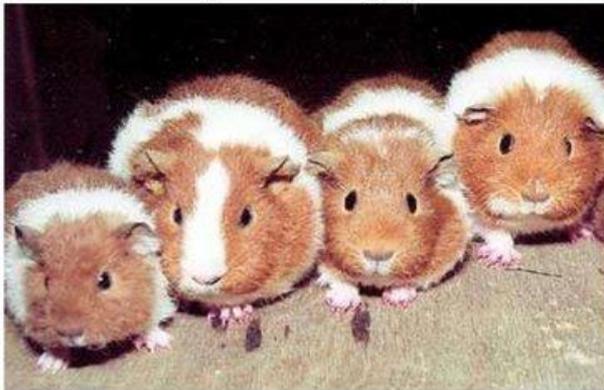
- повышение температуры тела,
- изменение рН в очаге воспаления,
- введение в организм противовирусных препаратов.

Культивирование вирусов

- Вирусы культивируют путем заражения лабораторных животных, куриных эмбрионов и культур клеток (тканей).
- Присутствие вируса в исследуемом материале определяют с помощью методов индикации и идентификации.
- **Индикация вирусов**, т.е. неспецифическое **обнаружение** факта инфицирования, основана на выявлении биологических свойств вирусов и особенностей их взаимодействия с чувствительными клетками.
- **Идентификация** означает установление **вида или типа вируса**.
- Она осуществляется в основном с помощью реакций иммунитета или молекулярно-генетических методов

Методы культивирования вирусов

- в организме лабораторных животных;
- в развивающихся куриных эмбрионах;
- в культурах клеток.



Культивирование вирусов в организме лабораторных животных



- Выбор экспериментальных животных определяется целью работы и видовой **чувствительностью** к изучаемому вирусу. Для заражения используют обезьян, кроликов, морских свинок, хомячков, белых крыс и мышей.
- Способ заражения зависит от тропизма вируса к определенным тканям: **нейротропные, респираторные, дерматотропные** вирусы и т.д. Наиболее часто используются накожное, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное и внутримозговое заражение.

В. Культивирование вирусов в организме лабораторных животных

- **Ограничено:** когда невозможно использовать более удобные системы
- Преимущественно **новорожденные** (*белые мыши и крысят, кролики, морские свинки, хомячки, обезьяны*)
- Вид животного зависит от **видовой чувствительности к вирусу**
- Заражение животных по **принципу цитотропизма вируса:**
 - нейротропные (*в. бешенства, КЭ*) – интрацеребрально
 - респираторные (*в. гриппа*) – интраназально
 - дерматотропные (*в. герпеса*) – на кожу
- **Индикация вируса:**
 - заболевание животного
 - **гибель животного.** При первичном заражении животное может не заболеть, поэтому ч/з 5-7 дней внешне здоровых животных убивают, из их органов готовят суспензию, которой заражают следующее животное («пассажи»).
 - патоморфологические и патогистологические изменения в тканях и органах
 - + РГА с экстрактами из органов
- **Идентификация вируса:** РН

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.

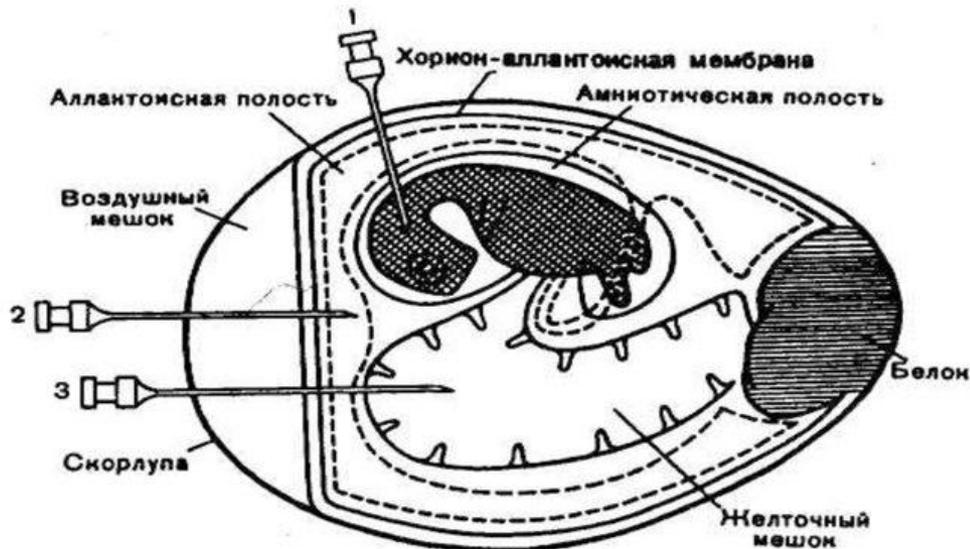


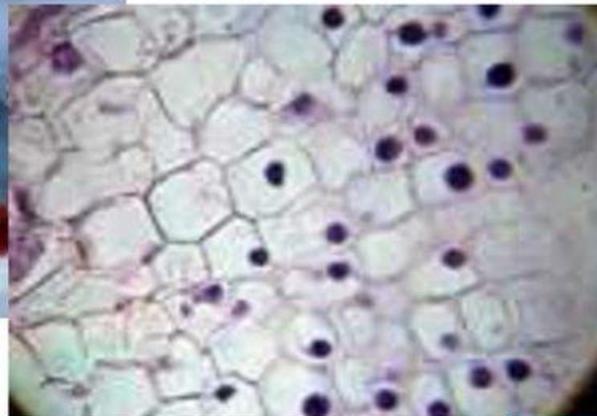
Рис.5.2.1. Способы заражения куриного эмбриона.

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

3. На культуре клеток



Культивирование вирусов в культуре ткани



Выделение и культивирование вирусов

- **Вирусосодержащий гомогенат ткани**
 - Заражение культуры клеток.
- **Анализ через 18 – 72 часа:**
 - цитопатическое действие, разрушение монослоя;
 - + реакция гемадсорбции (если вирус гемагглютинирующий);
 - + метод флюоресцирующих антител;
 - + электронномикроскопический морфологический анализ .



Культивирование вирусов

Виды культур клеток в зависимости от числа жизнеспособных генераций:

- **Неперевиваемые клетки** первично-трипсинизированные (способны размножиться однократно)
- **Полуперевиваемые клетки** (способны размножиться в течение 40—50 пассажей)
- **Перевиваемые** способны перевиваться в лабораторных условиях в течение неопределенно длительного срока (**раковые клетки или нормальные клетки зародыша**).

Классификация культур клеток

1. По технике приготовления:

- *Однослойные*, способные прикрепляться и размножаться на поверхности стекла лабораторной посуды
- *Суспензированные*, размножающиеся во всем объеме питательной среды
- *Органнне*, представленные цельными кусочками органов, сохраняющих структуру вне организма

2. По числу жизнеспособных генерации:

- *Первичные*, способные размножаться в первых генерациях
- *Перевиваемые (стабильные)*, способные размножаться неопределенно долго
- *Полуперевиваемые*, с ограниченной жизнью 40-50 пассажами

Типы сред для культивирования культур клеток

- **Естественные питательные среды** (применяются редко)

Естественные питательные среды готовят на основе солевых растворов Хенкса и Эрла, к которым добавляют сыворотку, амниотическую жидкость, эмбриональный экстракт. Например, среда для культивирования клеток HeLa: сыворотка человека – 50%, куриный эмбриональный экстракт – 2%, раствор Хенкса – 48%.

- **Ферментативные гидролизаты белковых веществ.**

В среды добавляют ферментативные гидролизаты: лактальбумина, казеина, белков крови крупного рогатого скота.

- **Синтетические питательные среды**, которые отличаются сложным составом:

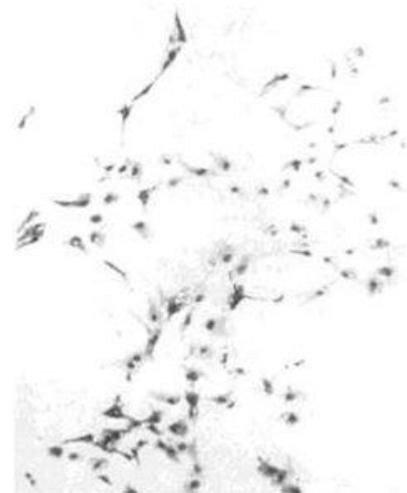
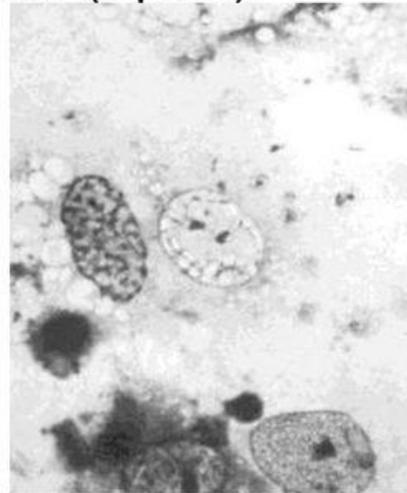
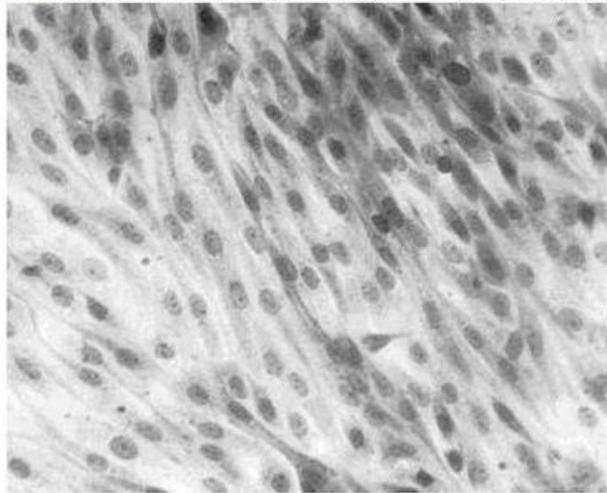
Среда 199 (Паркера) содержит 20 аминокислот, 17 витаминов, пурины и пиримидины, глюкозу, 9 минеральных солей и ряд других веществ. Эту среду готовят на солевом растворе Хенкса, стерилизуют фильтрованием через бактериальные фильтры.

Среда Игла содержит 13 аминокислот, 4 катиона, 3 аниона, 6 витаминов, холин, инозит и углеводы.

Индикация вирусов в культуре клеток

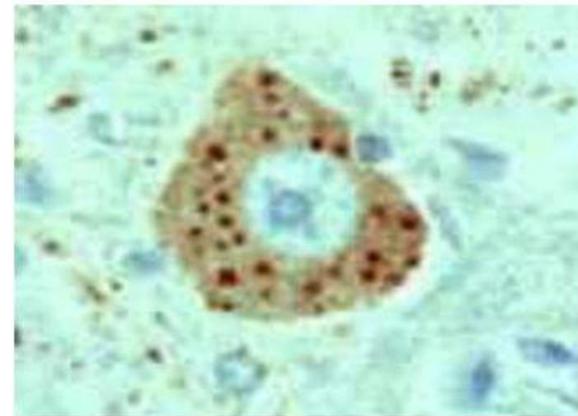
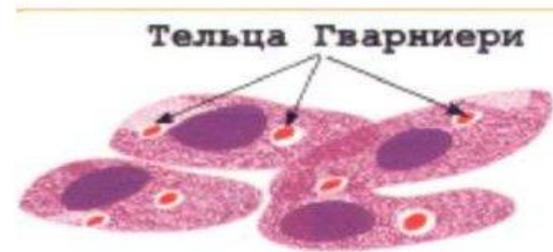
Цитопатическое действие (ЦПД) – видимые под микроскопом морфологические изменения клеток в результате внутриклеточной репродукции вирусов:

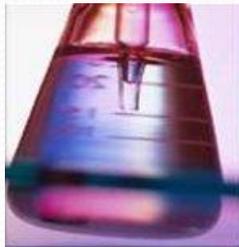
- слияние клеток с образованием синцития (парамиксовирусы, герпесвирусы);
- сморщивание и деструкция клеток (энтеровирусы, реовирусы);
- агрегация клеток (аденовирусы);
- зоны лизиса в монослое (ЦМВ).



Индикация вирусов в культуре клеток

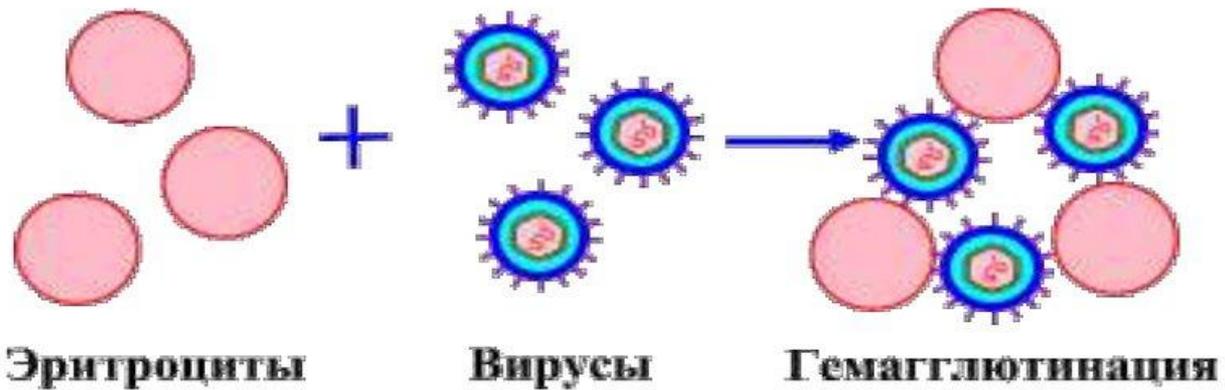
- **Вирусные включения** – скопление вирусных частиц или отдельных компонентов вирусов в цитоплазме или ядре клеток, выявляемые под микроскопом при специальном окрашивании.
- Характерные ядерные включения формируются в клетках, зараженных вирусами герпеса, аденовирусами, гриппа, бешенства, оспы и др.





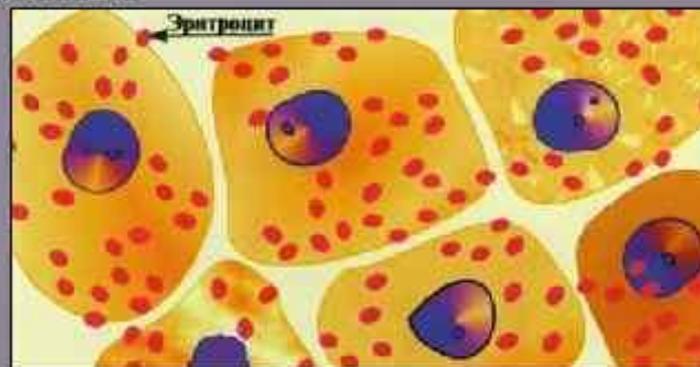
Индикация вирусов

- **Реакция гемагглютинации** - основана на способности некоторых вирусов вызывать агглютинацию (склеивание) эритроцитов



Реакция гемадсорбции (РГАдс)

- ▣ Используется только для индикации вирусов, содержащих **гемагглютенины**
- ▣ Компоненты:
 - культура клеток
 - **взвесь эритроцитов** (наносится на клетки культуры), инкубация, промывка, окраска.
- ▣ Учёт – световая микроскопия
- ▣ При наличии вируса с гемагглютинидами на поверхности клеток видны эритроциты, при отсутствии – эритроцитов нет.



ИНДИКАЦИЯ ВИРУСА: ЦВЕТНАЯ ПРОБА СОЛКА

- Самый простой метод индикации вирусов в культуре клеток.
 - Сущность его заключается в визуальной оценке окраски питательной культуральной среды.
 - При жизни клеток в культуре они выделяют в питательную среду кислые продукты своего метаболизма, вызывая изменение цвета индикатора с красного на желтый уже на третьи сутки.
 - При развитии вируса в культуре клеток он нарушает функционирование клеток вплоть до их гибели. Отмечается задержка изменения цвета среды более 6 дней, что и позволяет сделать заключение о присутствии вируса в культуре.
- 

3. Цветная проба



4. Реакция бляшкообразования (РБО)

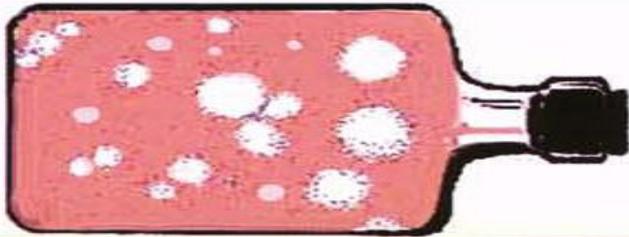


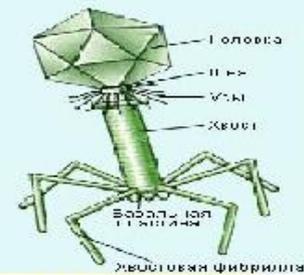
Рис. 4.14. «Бляшки» (негативные колонии вируса)

«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.

Негативные колонии на культуре клеток



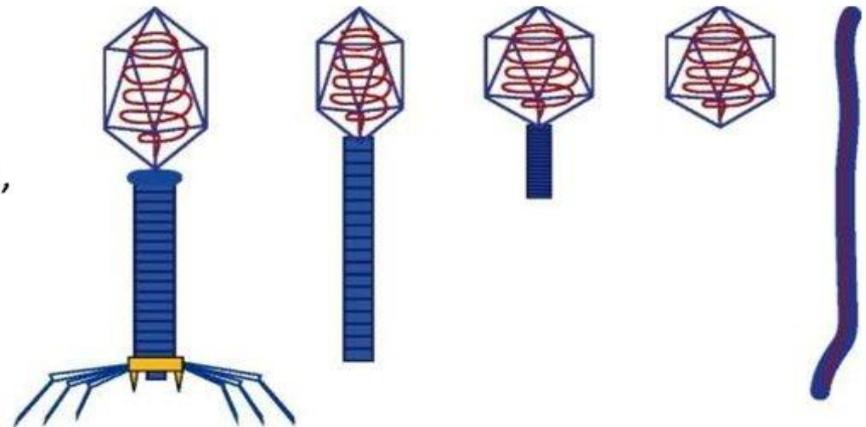
Вирусы бактерий



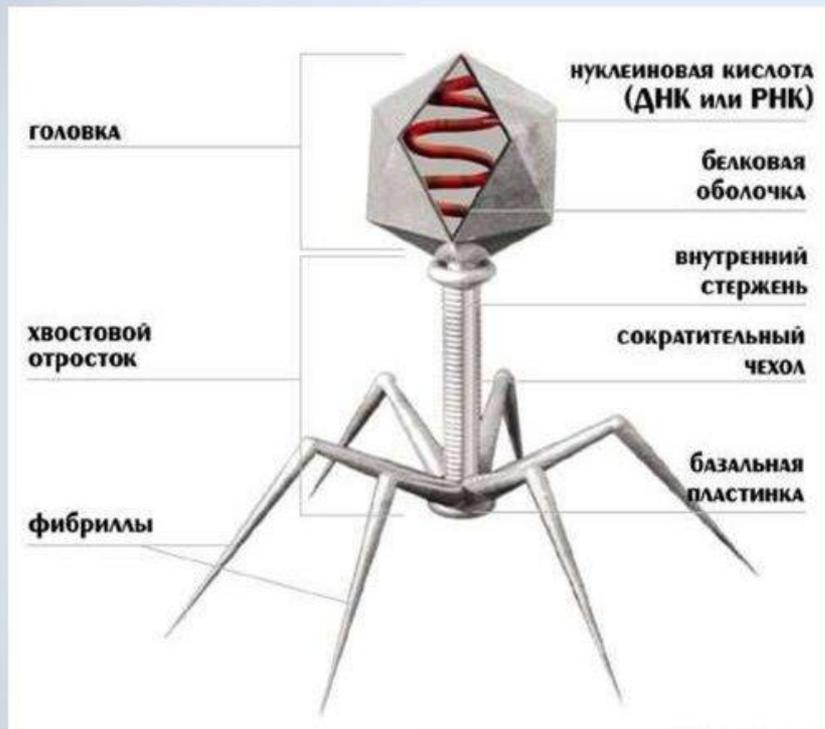
- Бактериофагами называют вирусы, живущие в бактериях.
- **Бактериофаги** (от бактерии и греч. phagos — пожиратель; буквально — пожиратели бактерий), фаги, бактериальные вирусы, вызывающие разрушение (лизис) бактерий и других микроорганизмов. Бактериофаги размножаются в клетках, лизируют их и переходят в др., как правило, молодые, растущие клетки. Впервые перевиваемый лизис бактерий (сибиреязвенной палочки) наблюдал в 1898 русский микробиолог Н. Ф. Гамалея. В 1915 английский учёный Ф. Туорт описал это же явление у гнойного стафилококка, а в 1917 французский учёный Ф. Д'Эрелль назвал литический агент, проходящий через бактериальные фильтры.

Бактериофаги

- **Бактериофаги** состоят из белка - капсида, имеющего один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК, одноили двунитевой).
- Различают бактериофаги:
 - с длинным отростком,
 - имеющие сокращающийся или не сокращающийся чехол,
 - бактериофаги с короткими отростками, с аналогами отростков,
 - без отростков
 - нитевидные



Строение бактериофага



Бактериофаги имеют более сложное строение, чем другие вирусы.

Строение бактериофага:

Головка (внутри содержится ДНК);

Полый стержень (окружен чехликом из сократительного белка);

Базальная пластинка (на ней закреплено «ножек»).

Бактериофаги

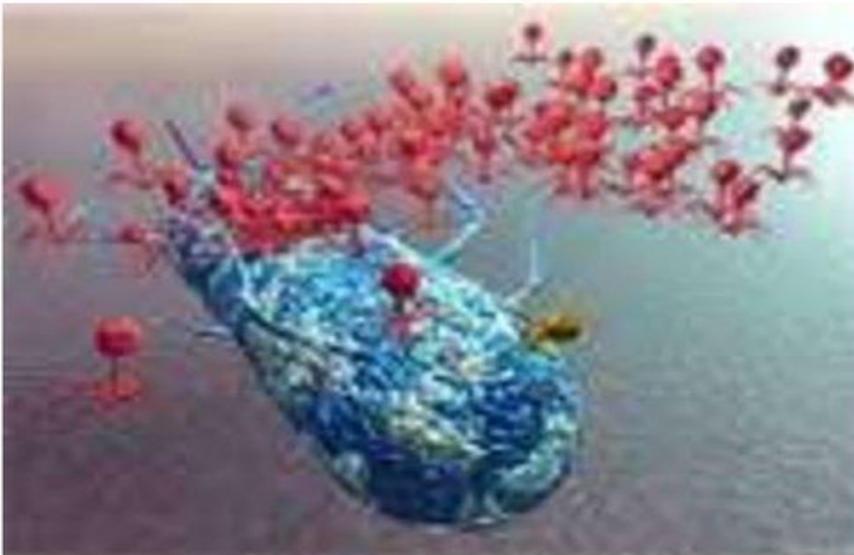
По механизму взаимодействия с клеткой выделяют:

- **Вирулентные** (реплицируются в клетке, вызывая её гибель);
- **Умеренные** (взаимодействуют с клеткой по интегративному типу). Могут быть дефектными, т.е., не способны давать фаговое потомство.

Взаимодействие фага с бактериальной клеткой

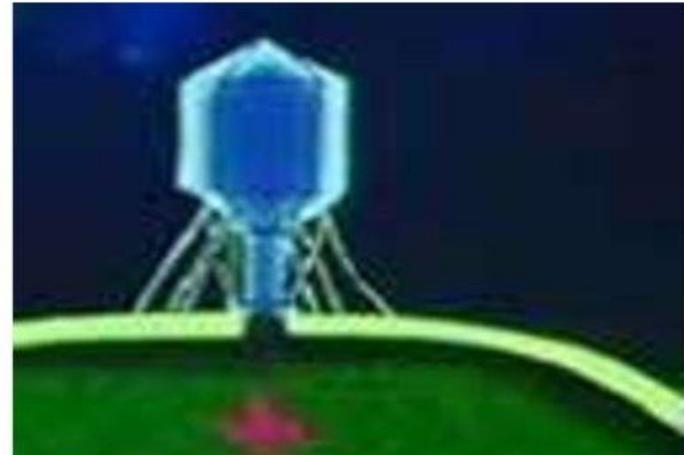
Вирулентные бактериофаги

- Продуктивный тип. Литический цикл.



Умеренные бактериофаги

- Интегративный тип. Лизогения. Профаг. Лизогенная (фаговая) конверсия.



Умеренные бактериофаги

- Умеренные бактериофаги взаимодействуют с бактериями по **продуктивному или интегративному типу**
- **Продуктивный** тип умеренного фага, как и у вирулентных фагов, заканчивается **лизисом бактерий**.
- При **интегративном** типе ДНК умеренного фага встраивается в хромосому бактерии, реплицируется синхронно с геномом бактерии, не вызывая ее лизиса (передается при делении бактерии).
- ДНК фага, встроенная в хромосому бактерии, называется **профагом**, культура бактерий - **лизогенной**, а сам процесс - **лизогенией** (от греч. lysis - «разложение» и genea - «происхождение»).
- При лизогении в результате «выключения» фаговых генов репрессором, кодируемым одним геном фага, **фаги не образуются**.

Взаимодействие бактериофага с бактериальной клеткой

- Синтез ДНК и белка

- Формирование



Применение фагов

Фаги используют в диагностике инфекционных болезней - с помощью известных (диагностических) фагов проводят идентификацию выделенных культур микроорганизмов. В силу высокой специфичности фагов можно определить вид возбудителя или варианты (типы) внутри вида. Фаготипирование имеет большое эпидемиологическое значение, т.к. позволяет установить источник и пути распространения инфекции;

с помощью тест-культуры можно определить неизвестный фаг в исследуемом материале, что указывает на присутствие в нем соответствующих возбудителей.

Фаги применяют для лечения и профилактики инфекционных болезней. Производят брюшнотифозный, дизентерийный, синегнойный, стафилококковый фаги и комбинированные препараты. Способы введения в организм: местно, энтерально или парентерально.

Умеренные фаги используют в генетической инженерии и биотехнологии в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.

Применение бактериофагов

1. **Диагностика инфекционных заболеваний** (индикация и фаготипирование выделенного возбудителя)
2. **Выявление бактериального загрязнения окружающей среды** – вода, почва, смывы с больничного оборудования и пр. (эпидемиологические исследования для поиска источника инфекции, путей передачи)
3. **Лечение инфекционных больных** (жидкие фаги, таблетированные формы): брюшным тифом, дизентерией, стафило-стрептококковыми инфекциями и т.д.
4. **Профилактика инфекционных заболеваний**
5. **Использование в качестве модели** для решения теоретических и практических вопросов вирусологии, генетики и т.д.

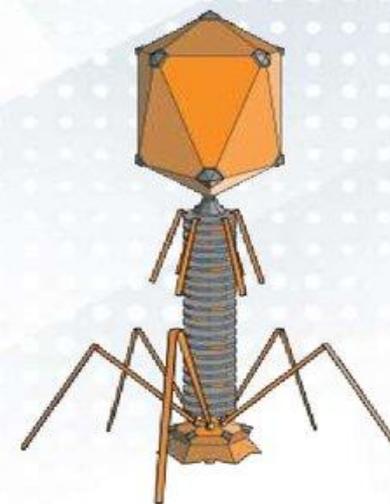
Бактериофаги

По специфичности действия:

- Полифаги
- Монофаги
- Типовые фаги

По назначению:

- *Лечебно-профилактические*
- *Диагностические*



NB! Вводить диагностические бактериофаги в организм человека категорически запрещается!

Бактериофаги

- По степени специфичности различают бактериофаги:
 - поливалентные, взаимодействующие с родственными видами бактерий;
 - моновалентные, взаимодействующие с бактериями определенного вида;
 - типовые, взаимодействующие с отдельными типами (вариантами) данного вида бактерий.

Бактериофаги

- **Бактериофаги** – это иммунобиологические препараты, состоящие из фагов (вирусов бактерий).
- **Получение:** инфицирование фагом культуры бактерий, чувствительной к данному фагу. Затем их фильтруют, концентрируют, очищают. Бактериофаги выпускают в виде таблеток, в сухом и жидком виде.
- Бактериофаги применяют для **профилактики и лечения** ряда бактериальных, чаще всего кишечных инфекций (холера, брюшной тиф, дизентерия). Препарат назначают перорально или местно.



Фагоиндикация и фаготипирование бактерий

- **Типовые фаги** применяются для фаготипирования культур. Есть специальные коллекции типовых фагов, активных против патогенных микроорганизмов. Эти фаги позволяют установить источники ряда инфекций.
- При помощи **видовых** специфических фагов можно установить наличие определенных видов патогенных и условно-патогенных микробов в объектах окружающей среды, в воде, в выделениях кишечника и других видах материалов от человека и животных.

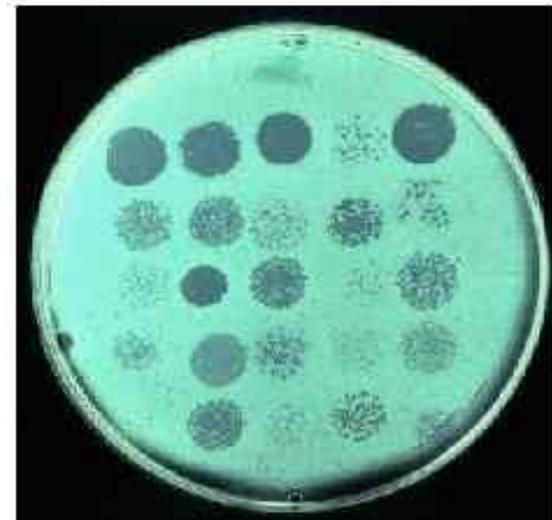
Фаготипирование

- **Фаготипирование** - один из методов эпидемиологического маркирования, применяется для выявления источника инфекции.
- Выделение бактерий одного фаговара от разных больных указывает на общий источник их заражения.
- Для определения фаговара (фаготипа) бактерий на чашку Петри с плотной питательной средой, засеянной чистой культурой возбудителя в виде газона, наносят капли различных диагностических типоспецифических фагов.
- Бактерии, чувствительные к фагу, лизируются (образуется стерильное пятно, бляшка, или так называемая негативная колония фага).

фаготипирование.

- ▶ 1. Типируемый штамм **засевают газоном** на пластинчатый агар.
- ▶ 2. Затем на засеянную поверхность **капают капли типовых бактериофагов** (каждую в свой квадрат, помеченный заранее, например, стеклогрифом на дне чашки Петри).
- ▶ 3. Чашку с посевом **инкубируют** в термостате.
- ▶ 4. Учитывают опыт, **регистрируя «стерильные пятна»** или «*бляшки*» – места отсутствия роста в месте нанесения капли бактериофага, к которому чувствителен данный вариант бактерий
- ▶ 5. **Фаговар** (фаготип) обозначается путем перечисления типовых фагов, лизирующих данный вариант.

Стерильные пятна, образованные
типовыми бактериофагами



Фаготипирование *S. aureus* тип

А



Определение активности бактериофагов = фагоиндикация

–Количественные методы:

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

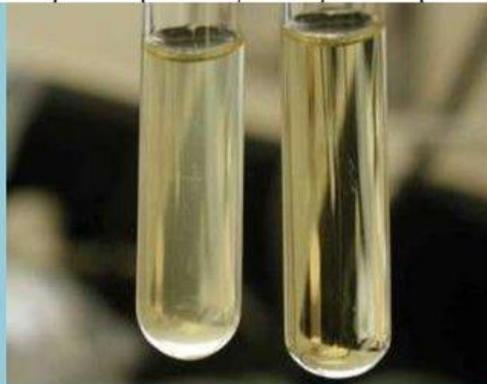
- Затем в каждую пробирку добавляют по 0,2мл бульонной культуры и ряды ставят в термостат.
- После инкубации в термостате учитывают результаты:

=в положительном случае наблюдается просветление среды.

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

Титрование в жидкой среде по Аппельману

Ингредиенты, мл	Пробирки												
	опыт										контроль		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	культуры	фага	
Бульон	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Исследуемый фаг	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5	—	0,5	—
Культура микроба	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	—
	Разведение фага												
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	—	10^{-1}	—
	Пробирки тщательно встряхивают и инкубируют при 37 °С 18—10 ч												
Результат	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—



Литическое действие бактериофагов (справа – положительный результат)

Определение активности бактериофагов = фагоиндикация

–Количественные методы:

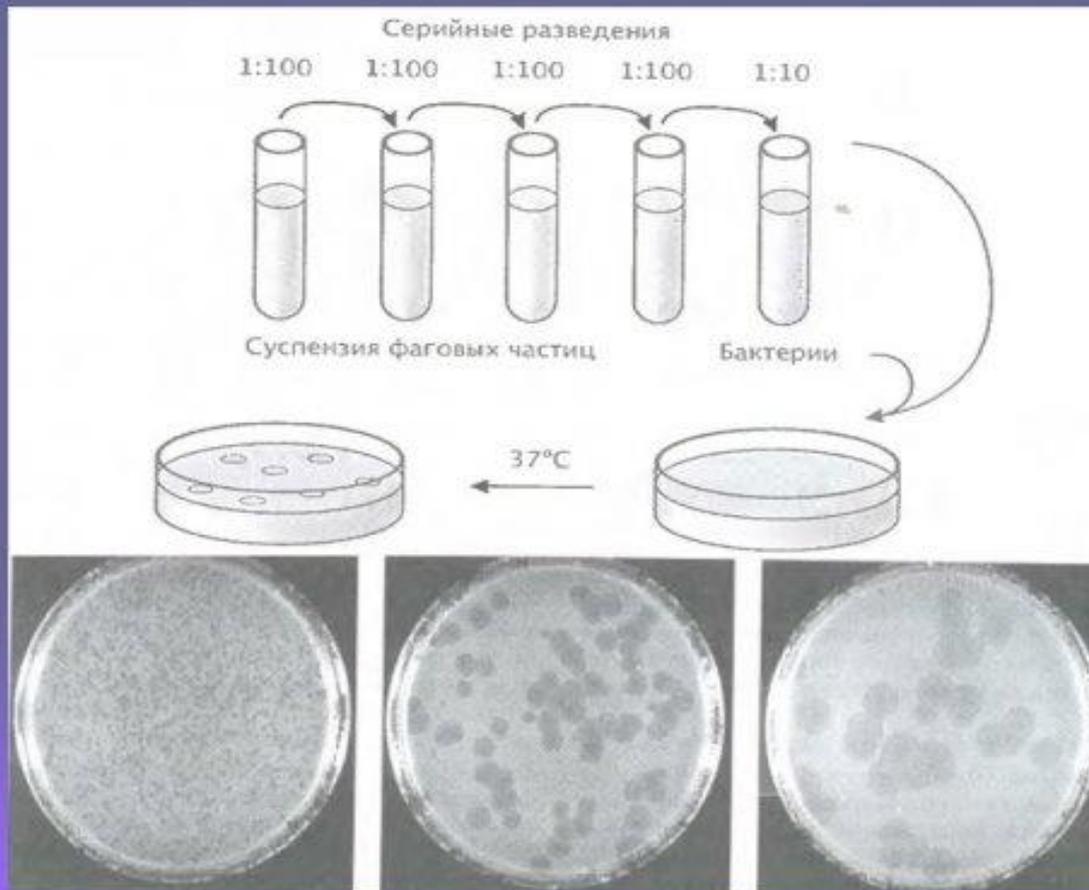
- А) **Метод Грациа**: готовят десятикратные разведения фага в хлориде натрия от 10^{-2} до 10^{-7}
- Затем по 0,5 мл из каждого разведения смешивают с таким же объемом бульонной культуры и 4 мл расплавленного и остуженного до 45 град. агара и выливают на чашки Петри.
- Когда агар застынет чашки помещают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

-одна фаговая частица образует одно «стерильное пятно»

- Величина, показывающая концентрацию фага называется

титром.

Титрование фагов



Морфология бляшек фагов Т4, Т3 и Т7

ФАГОИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ ПО МЕТОДУ ОТТО (МЕТОД СТЕКАЮЩЕЙ КАПЛИ)



На чашку с МПА шпателем выполняется посев суточной бульонной выделенной культуры бактерий. Затем наносят каплю известного бактериофага и, наклонив чашку, дают капле несколько растечься по поверхности питательной среды. Через сутки наблюдают полную задержку роста в месте внесения диагностического фага.

ФАГОИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ ПО МЕТОДУ ФЮРТА



- В расплавленный и остуженный МПА (45-50⁰С) добавляют определенный бактериофаг и выливают в чашку Петри. Чашка с полученным агаром делится на несколько секторов, в каждый из которых засеваются неизвестные культуры, выделенные от больных. Там, где культура соответствует бактериофагу, наблюдается отсутствие роста (лизис) бактерий.

Merci



Всем спасибо! Все свободны!