Морфологія та ультраструктура вірусів, хімічний склад. Принципи класифікації вірусів.

ВНМУ ім. М.І.Пирогова
Кафедра мікробіології

Вірусологія – це біологічна наука про морфологію, фізіологію, генетику, екологію та еволюцію вірусів

Медична вірусологія вивчає віруси-паразити людини, їх роль в етіології та патогенезі інфекційних та пухлинних хвороб, розробляє спеціальні методи діагностики, способи етіотропної терапії та специфічної профілактики

Віруси – це самостійна група неклітинних організмів, які проявляють ознаки живих істот лише знаходячись в чутливій клітині-хазяїні

Основні функціональні відмінності вірусів від прокаріотів і еукаріотів

- Відсутність здатності до росту і бінарного поділу
- Відсутність власних метаболічних систем
- Відтворення за рахунок нуклеїнової кислоти, яка містить інформацію про будову вірусу
- Використання для репродукції пластичного матеріалу, ферментів і рибосом клітини-хазяїна
- Відтворення вірусу можливе тільки в живій клітині (облігатний внутрішньоклітинний паразитизм)
- Унікальний спосіб розмноження (диз’ юнктивна репродукція)

Теорії походження вірусів

- **Ретроградно-еволюційна** – віруси – результат зворотного розвитку (регресу) бактерій або інших одноклітинних організмів
- **Цитогенезна** – віруси – це генетичні елементи клітини, які набули автономності в процесі еволюції
- **Цитогенезно-еволюційна** – віруси утворилися із генетичного матеріалу, а потім еволюціонували
- **Молекулярно-еволюційна** – віруси виникли із пробіонтів (найдавніші доклітинні форми життя). В процесі еволюції спочатку з‘явилися сапрофітні віруси, а при появі клітинних форм життя перейшли до паразитизму

Форми існування вірусів

- **Позаклітинна (віріон)** – цілі вірусні частки без ознак життя, наділені інфекційністю
- **Внутрішньоклітинна**

1. **Вірус** – вільна нуклеїнова кислота без оболонок
2. **Провірус** – нуклеїнова кислота, інтегрована в геном клітини-хазяїна

Віруси поділяються на канонічні та неканонічні

Неканонічні віруси

Вірусоїди – дефектні віруси, геном яких не містить повної інформації про структуру вірусів, мають оболонку

Віроїди – представлені кільцевою РНК, не мають оболонки, фітопатогенні

Плазміди – представлені кільцевими ДНК, що реплікуються в бактеріальних клітинах

Ретротранспозони – однониткові РНК

Пріони – інфекційні білки, здатні до самовідтворення, не містять нуклеїнових кислот

Морфологія та хімічний склад канонічних вірусів

- **Розміри** – від 15-40 нм до 180-350 нм
- **Форма** – сферична, багатогранна, кулеподібна, сперматозоїдна, паличкоподібна
- **Хімічний склад** – нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди, вуглеводи

- **Ультраструктура:**

- геном (ДНК або РНК)
- оболонка (капсид та суперкапсид)

1. **Прості віруси** – мають одну оболонку – капсид
2. **Складні віруси** – мають капсид і суперкапсид

- рецепторна система (глікопротеїдні або гліколіпідні молекули)
- необов’язкові компоненти (ферменти зовнішні та внутрішні)

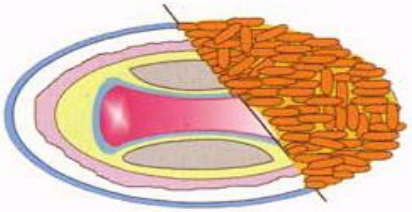
КЛАССИФИКАЦИЯ И МОРФОЛОГИЯ ВИРУСОВ

ВИРУСЫ С ОБОЛОЧКОЙ

ДНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ

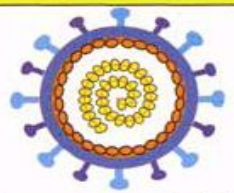
Herpesviridae

Hepadnaviridae

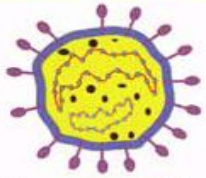

Poxviridae

РНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ

Coronaviridae

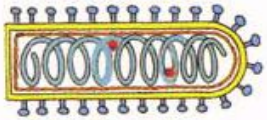

Paramyxoviridae

Bunyaviridae


Arenaviridae

Orthomyxoviridae

Retroviridae


Rhabdoviridae

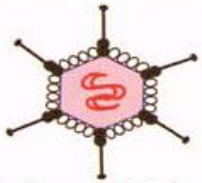
Togaviridae

Flaviviridae

Filoviridae

ВИРУСЫ БЕЗ ОБОЛОЧКИ

ДНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ


Adenoviridae

Polyomaviridae
Papillomaviridae

ДНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ

Parvoviridae

Circinoviridae

РНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ

Reoviridae

РНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ

Picornaviridae

Caliciviridae

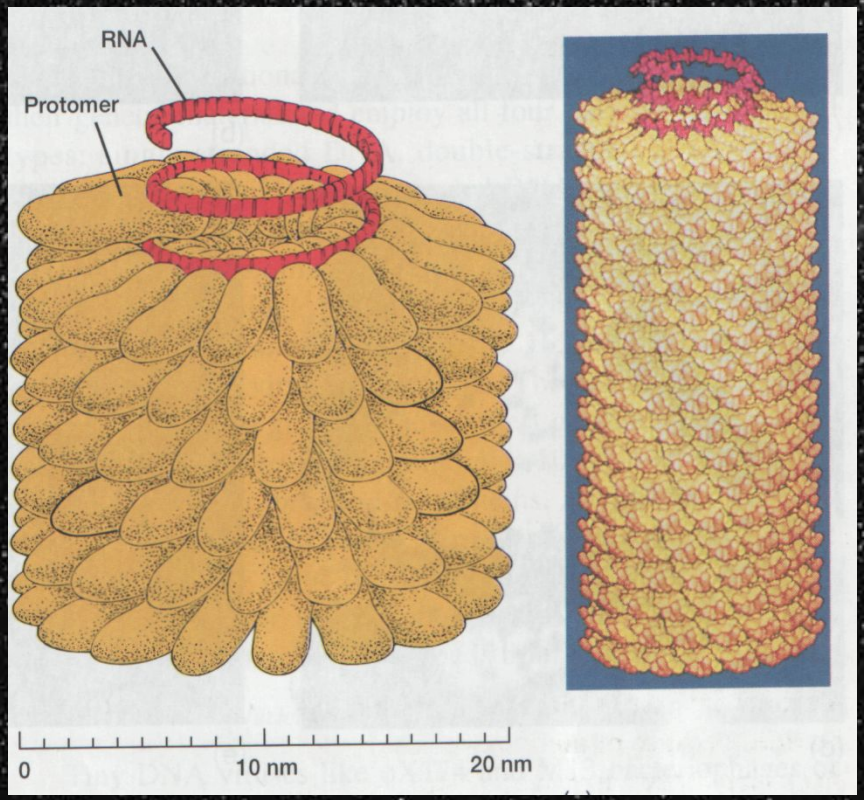
Рис. 4.6. Классификация и морфология вирусов

- **Капсиди можуть бути побудовані за різними типами симетрії:**

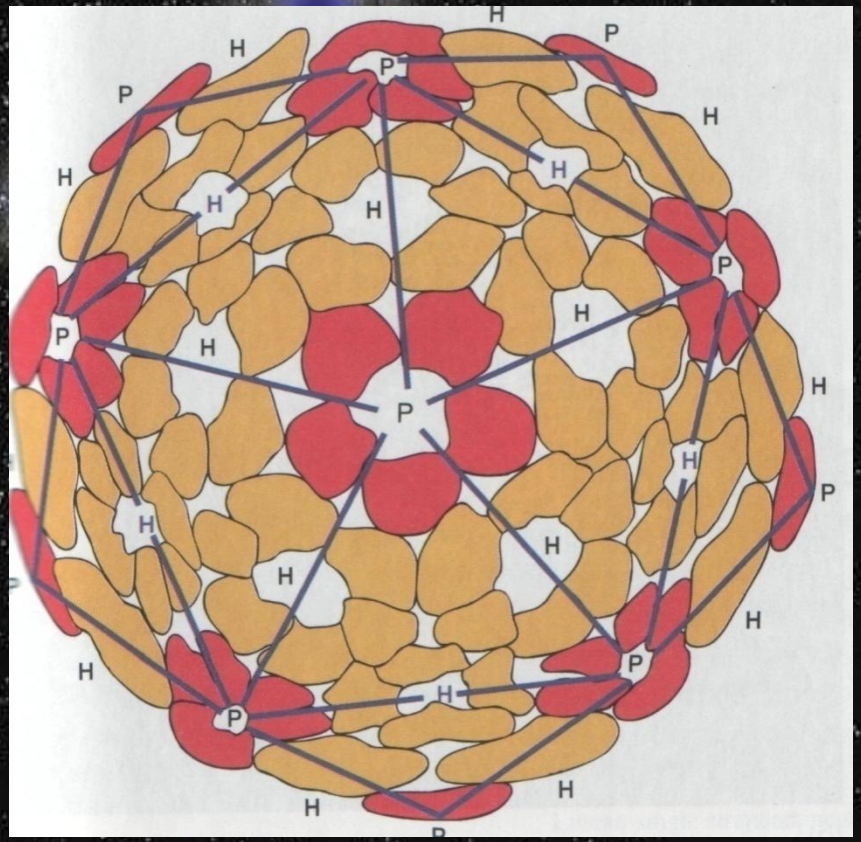
1. **Спіральним**
2. **Кубічним (ікосаедральним)**
3. **Змішаним**

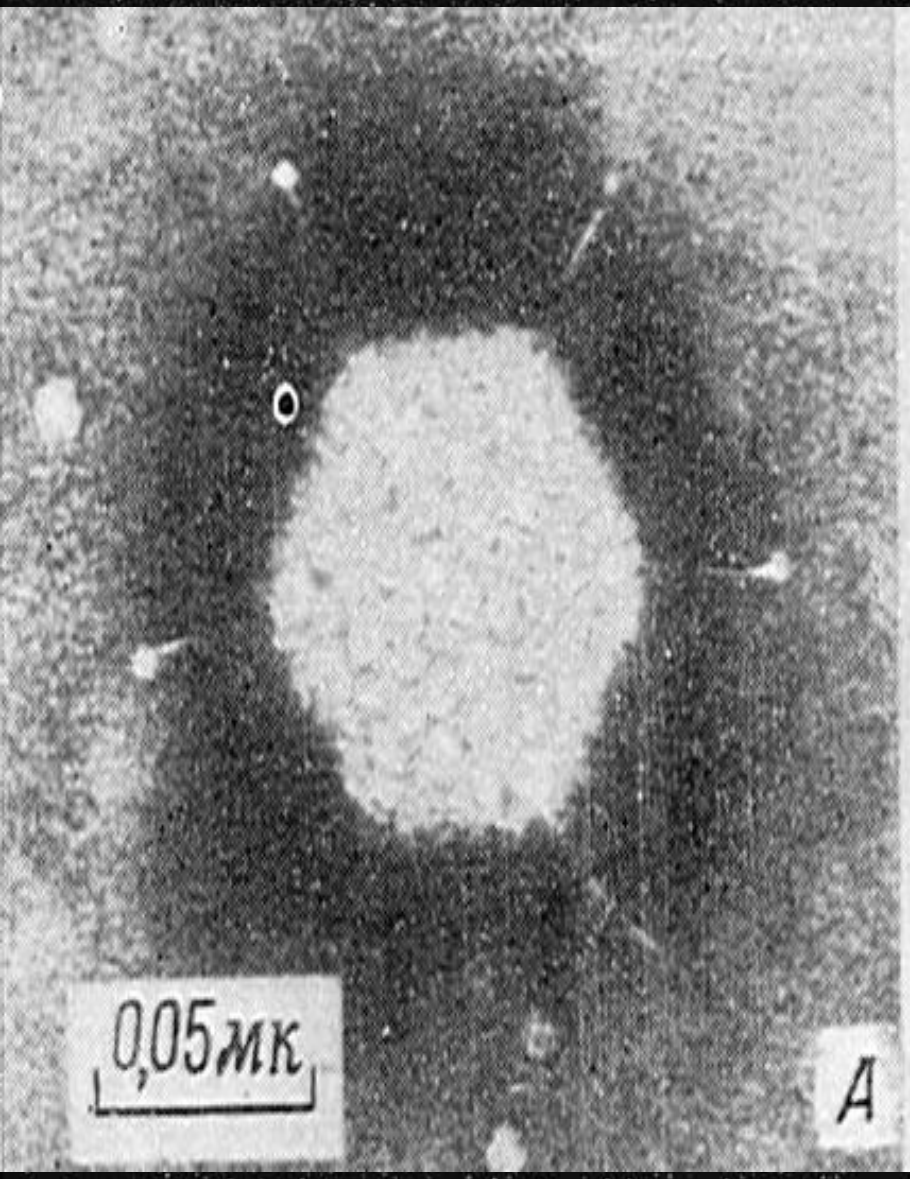
Типи вірусної симетрії

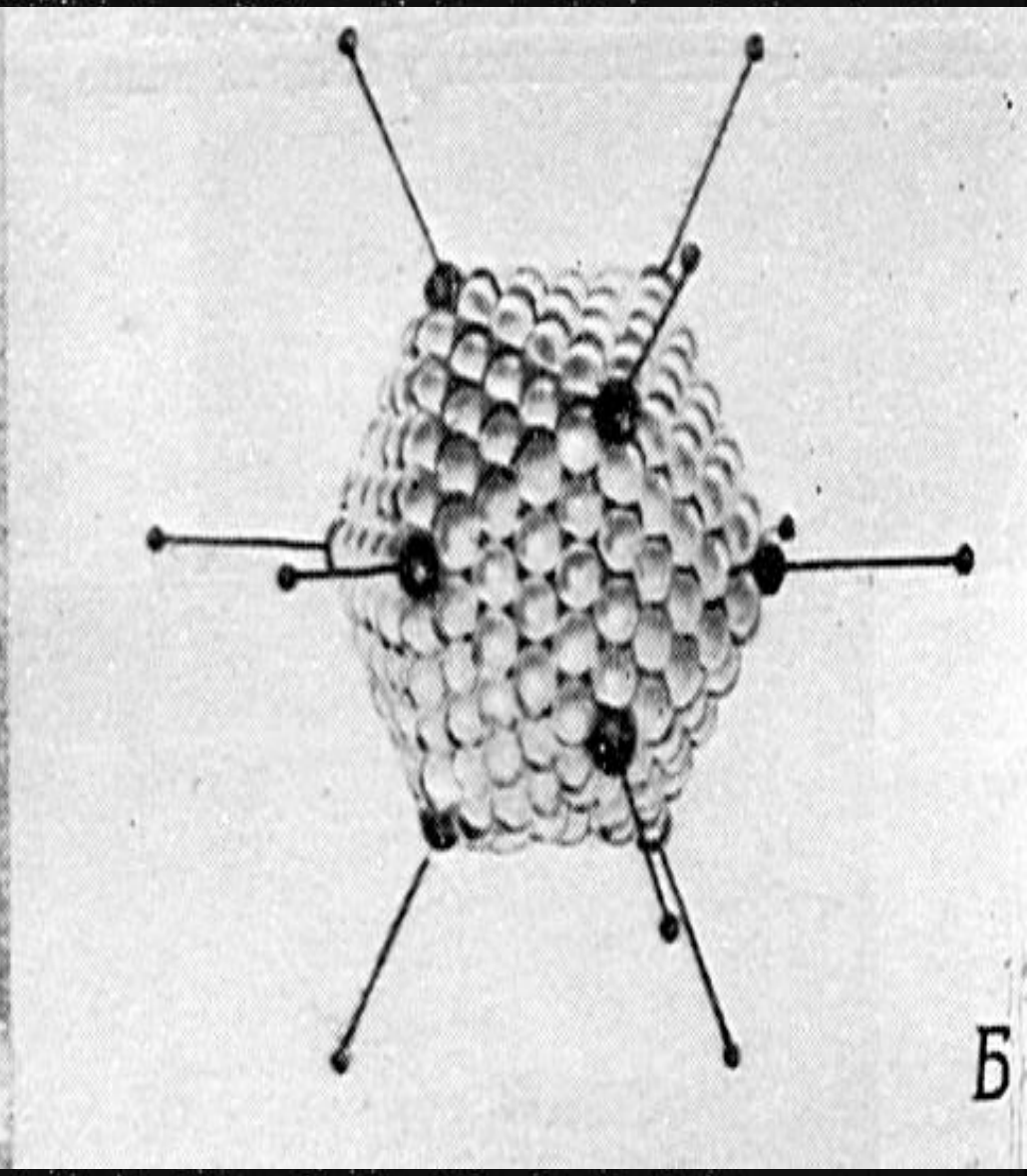
Спіральний тип

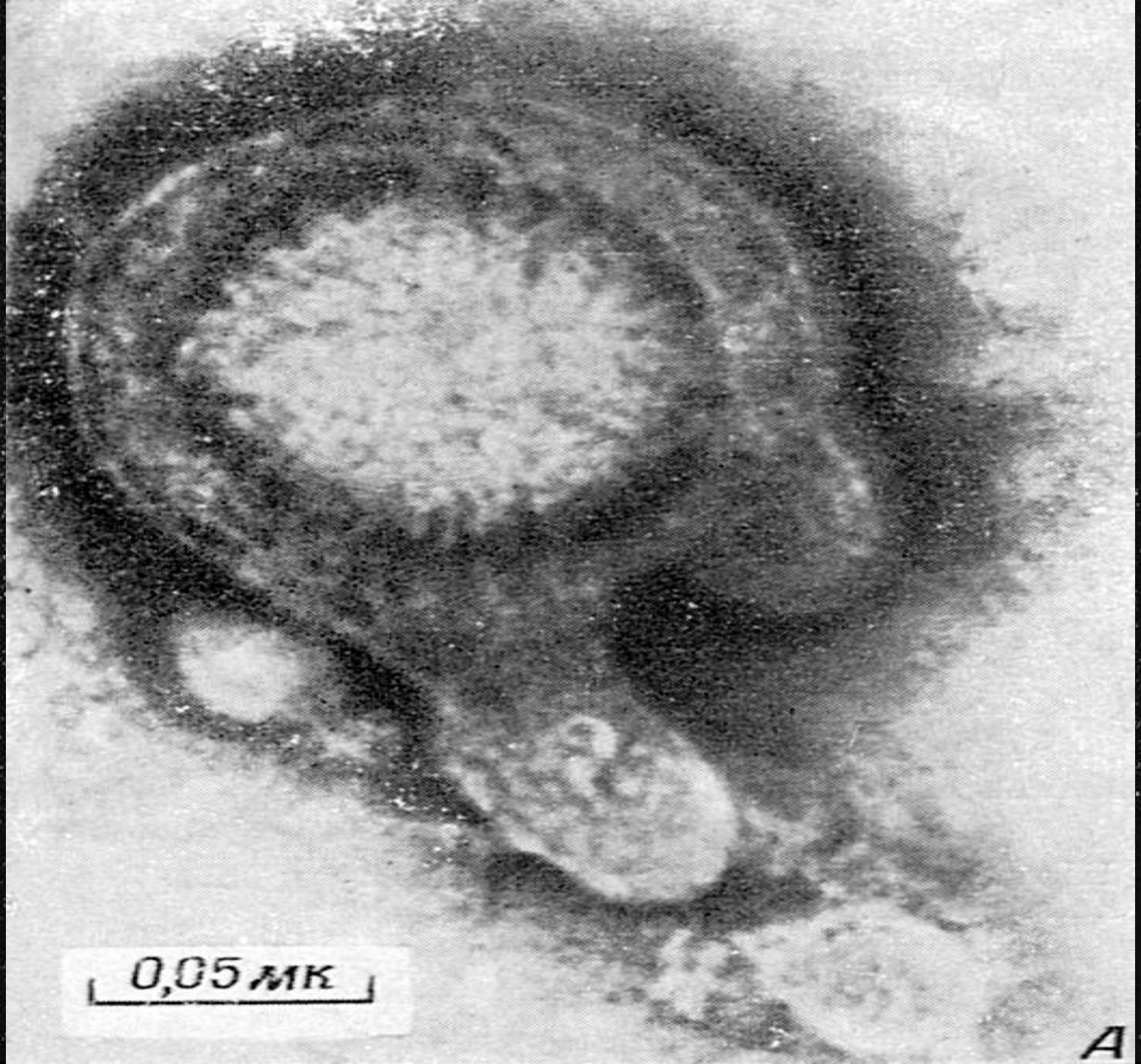


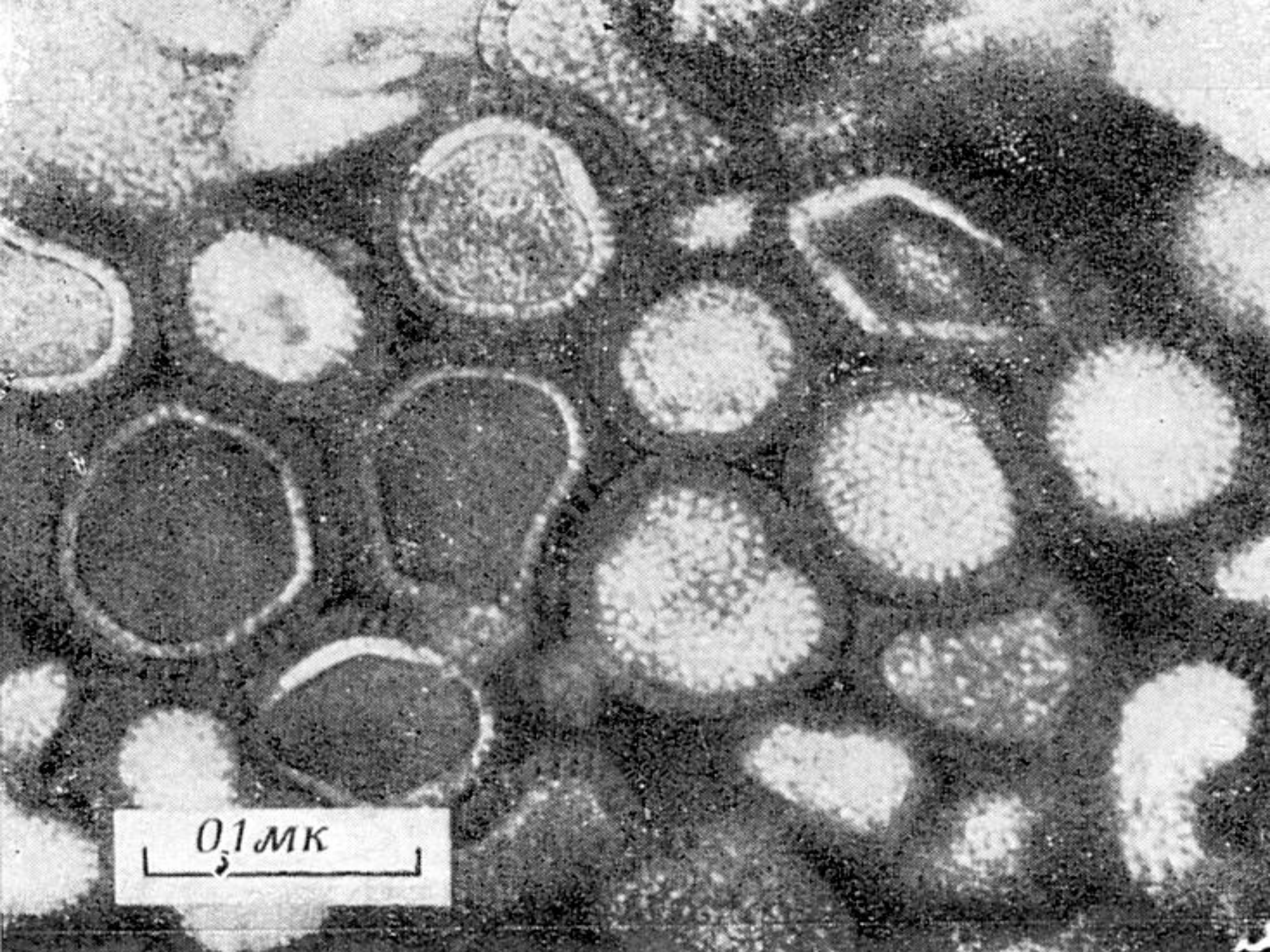
Кубічний тип




0,05мк
А

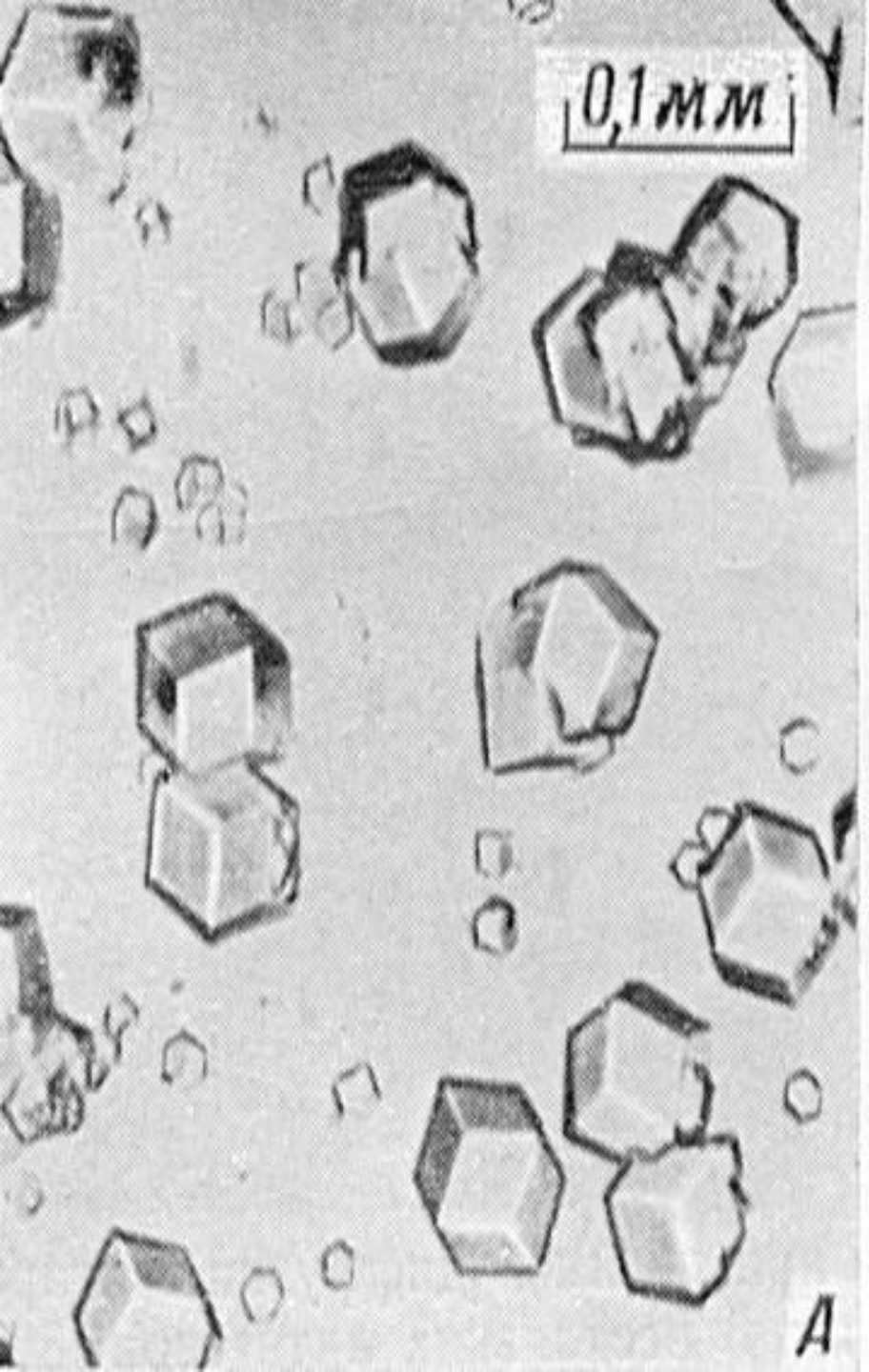

Б


0,05 мк
А


0,1 мк

0,1мк
А

0,1мк
Б


0,1мм
А

Б

Етапи репродуктивного циклу вірусів

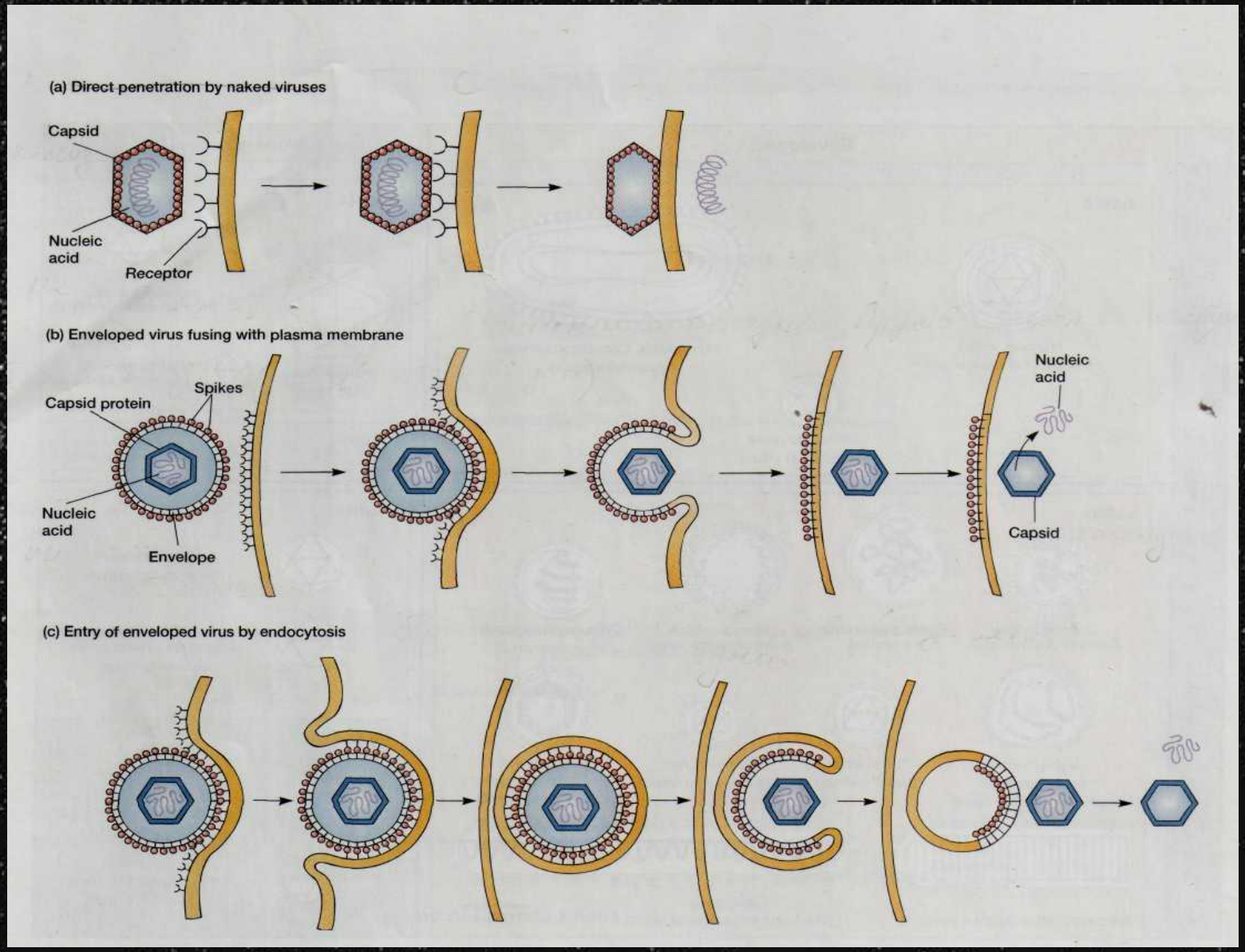
- **Адсорбція**

1. Фаза неспецифічної адсорбції – обумовлена електростатичними силами (зворотня)
2. Фаза специфічної адсорбції (рецепторна)

•Пенетрація

- **віропексис (рецепторний ендоцитоз)** – прості, складні віруси
- **злиття мембран** – складні віруси
- **пряме проникнення** – прості віруси, які мають здатність проривати клітинну оболонку
- **трансфекція** – проникненнення вільної нуклеїнової кислоти
- **інокуляція** – спосіб проникнення бактеріофагів шляхом ін‘єктування нуклеїнової кислоти

Способи проникнення вірусів



- **Дезінтеграція (депротеїнізація)-** відбувається вивільнення нуклеїнової кислоти віріону із оболонок, які руйнуються лізосомальними ферментами клітини-мішені
- **Диз'юнктивна репродукція**

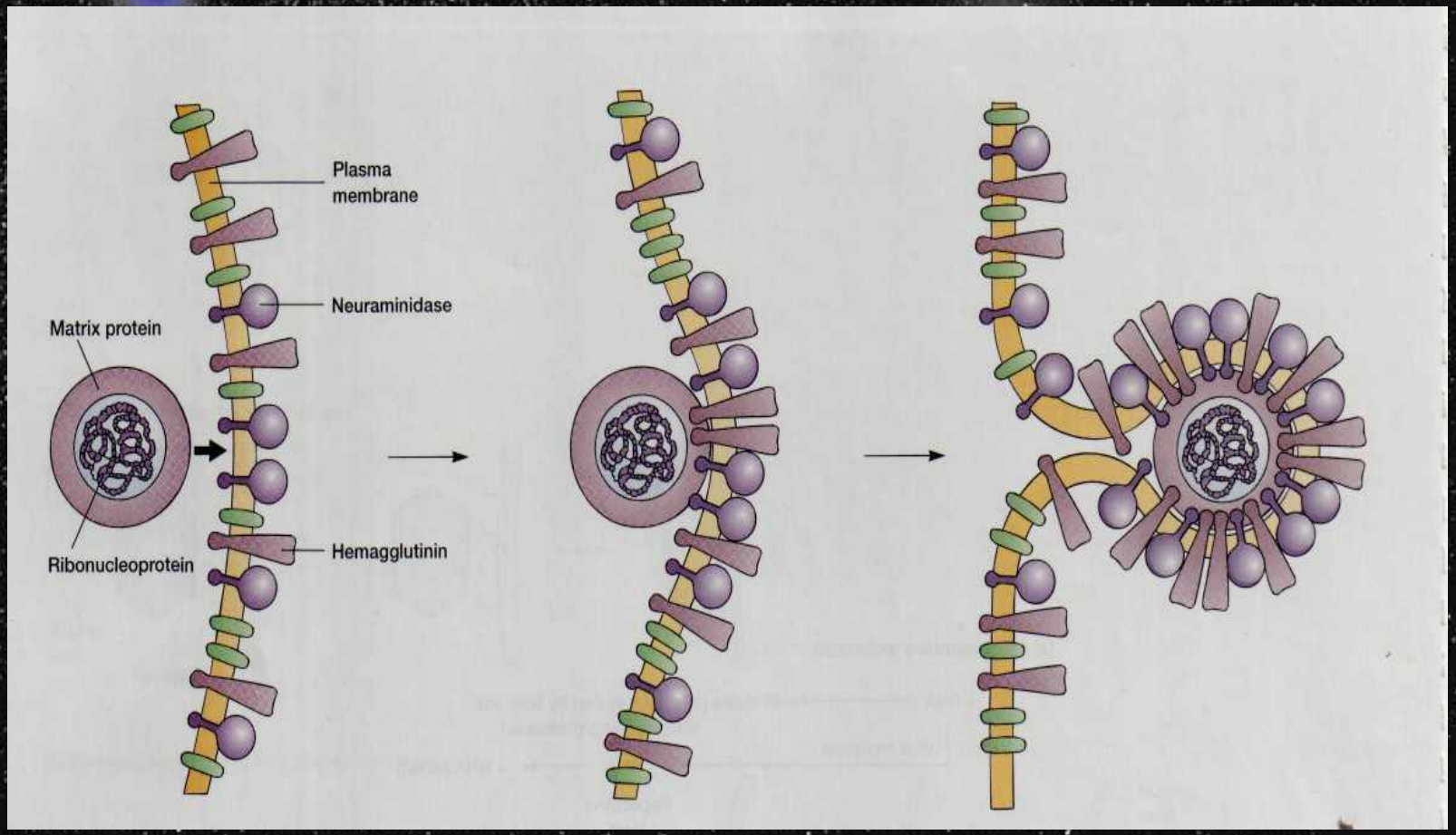
- транскрипція (синтез інформаційної РНК)
- трансляція (синтез вірусоспецифічних ферментів і вірусних структурних білків)
- реплікація (синтез вірусних нуклеїнових кислот)

Етапи репродуктивного циклу вірусів

- **Морфогенез віріонів** – самозбирання віріонів в клітині шляхом з‘єднання нуклеїнової кислоти з капсомерами
- **Вихід із клітини**

- **Брунькування** (складні віруси)
- **”вибух” клітини** (прості віруси)

Вихід вірусів брунькуванням



Типи взаємодії вірусу з клітиною

- **Продуктивний тип** – характеризується утворенням повноцінних віріонів в чутливих клітинах
- **Абортивний тип** – характеризується утворенням або малої кількості вірусних частинок або повною їх відсутністю
- **Інтегративний тип (вірогенія)** – інтеграція вірусної нуклеїнової кислоти в геном клітини. При вірогенії репродукція вірусу не відбувається, клітина нормально функціонує, але може відбутись її трансформація

Особливості вірусних інфекцій

- Віруси є генетичними паразитами, потребують для власної репродукції системи клітини-хазяїна
- В патогенезі вірусних інфекцій основна роль належить його НК
- Вірусна НК здатна блокувати метаболізм клітини і переключати його на синтез вірусних НК і білків

- Вірусна НК в результаті продуктивного типу взаємодії викликає загибель клітини-хазяїна
- Вірусна НК в результаті абортивного типу взаємодії при надлишковому пригніченні метаболізму викликає загибель клітини-хазяїна
- Вірусна НК може тривало перебувати в геномі клітини-хазяїна в стані провірусу і передаватись дочірнім, викликати пухлинну трансформацію

Методи культивування вірусів

- В організмі чутливих лабораторних тварин
- В 10-денних курячих ембріонах
- В культурах клітин

- первинні (отримують шляхом трипсинізації шматочків тканин органів, дають 10 поколінь)
- напівперещеплювані (отримують з диплоїдних клітин, дають до 100 поколінь)
- перещеплювані (отримують з пухлинних клітин, дають необмежену кількість поколінь)

Індикація вірусів – це виявлення вірусів у досліджуваному матеріалі без встановлення їх належності до родини, роду, виду, сероваріанту

Методи індикації

- **Цитопатична дія віруса (ЦПД)** – загальні дистрофічні зміни клітин або специфічні ураження у вигляді включень або багатоядерних клітин – синцитіїв або симпластів

- **Бляшкоутворення** – бляшки – це осередки зруйнованих інфікованих вірусом клітин моношару, що заходиться під агаровим покриттям

Індикація вірусів

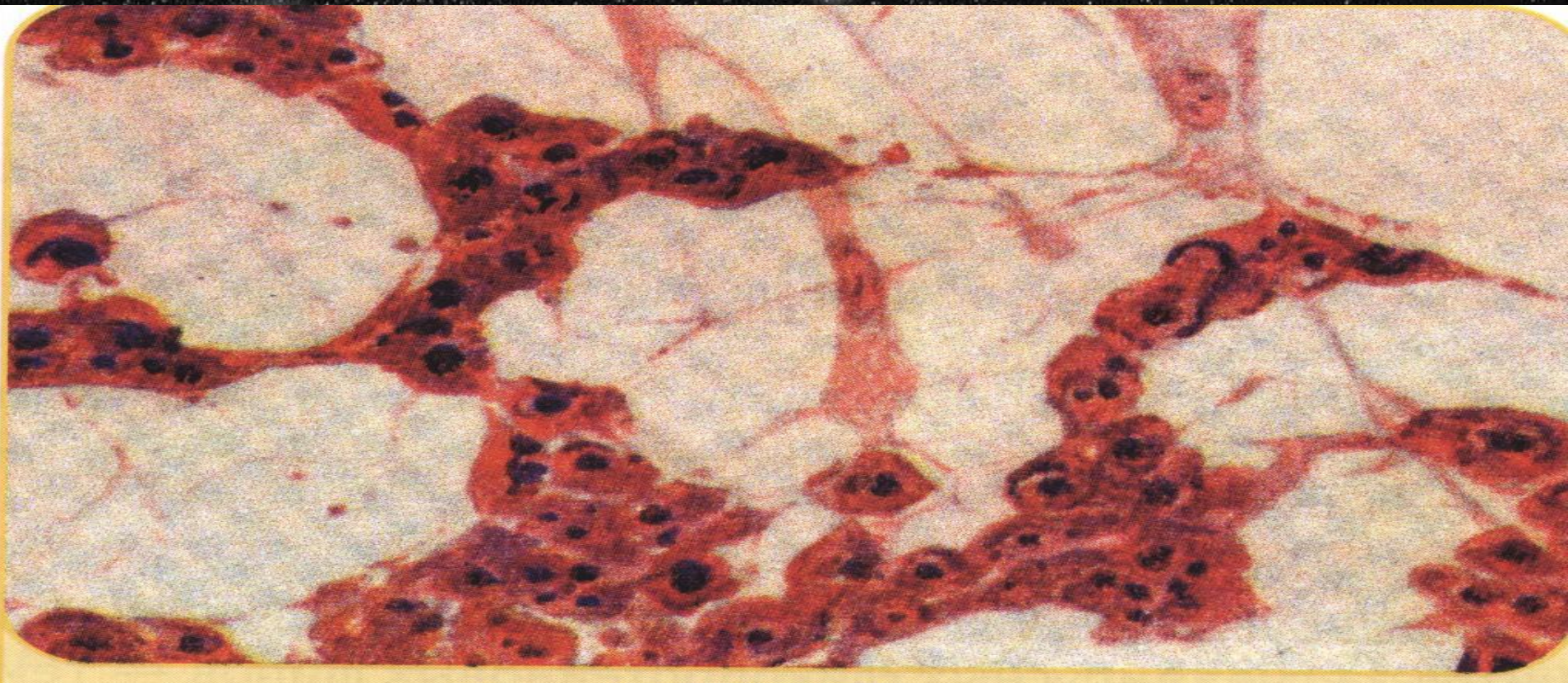


Рис. 4.12. ЦПД вируса

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

- **Кольорова проба** – використовують середовища Ігла або 199, які містять індикатор, який реагує на зміну pH середовища. При появі в клітині метаболітів середовище змінює забарвлення на жовте (інфіковані вірусом клітини – не метаболізують)

- **Реакція гемаглютинації (РГА)** основана на спроможності деяких вірусів, що мають гемаглютинін в оболонці склеювати еритроцити

- **Реакція гемадсорбції (РГадс)** – дозволяє виявити віруси, які містять гемаглютинін у клітинних культурах до розвитку ЦПД. На інфікованих вірусом клітинах спостерігається адсорбція еритроцитів

Індикація вірусів

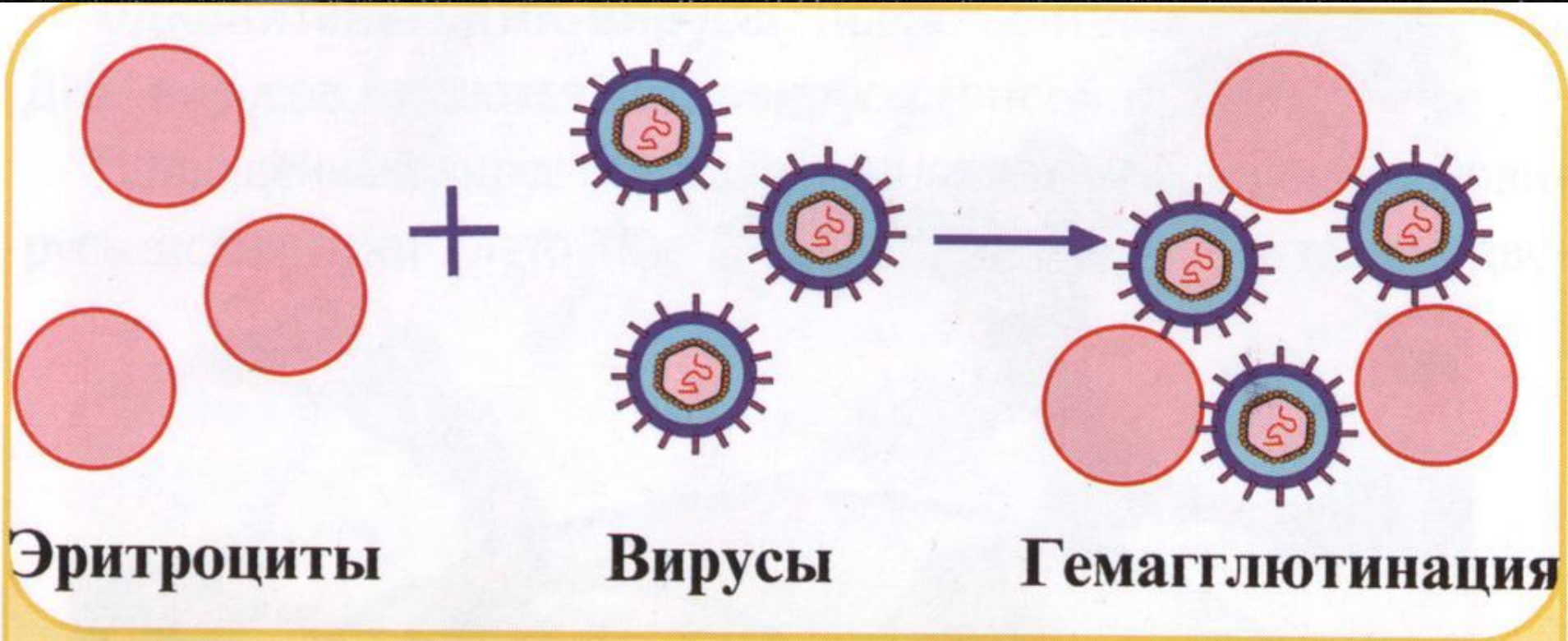


Рис. 4.15. Схема реакции гемагглютинации

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

Індикація вірусів

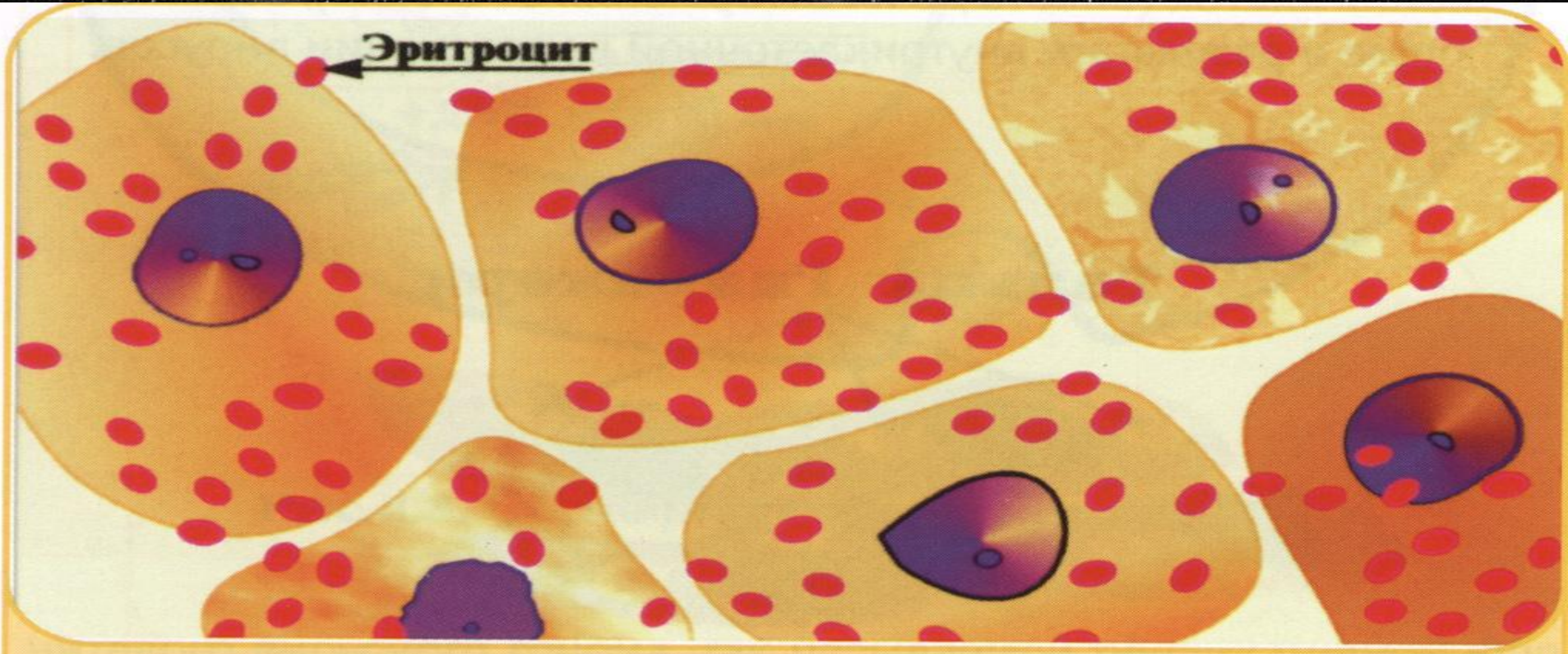


Рис. 4.16. Реакция гемадсорбции

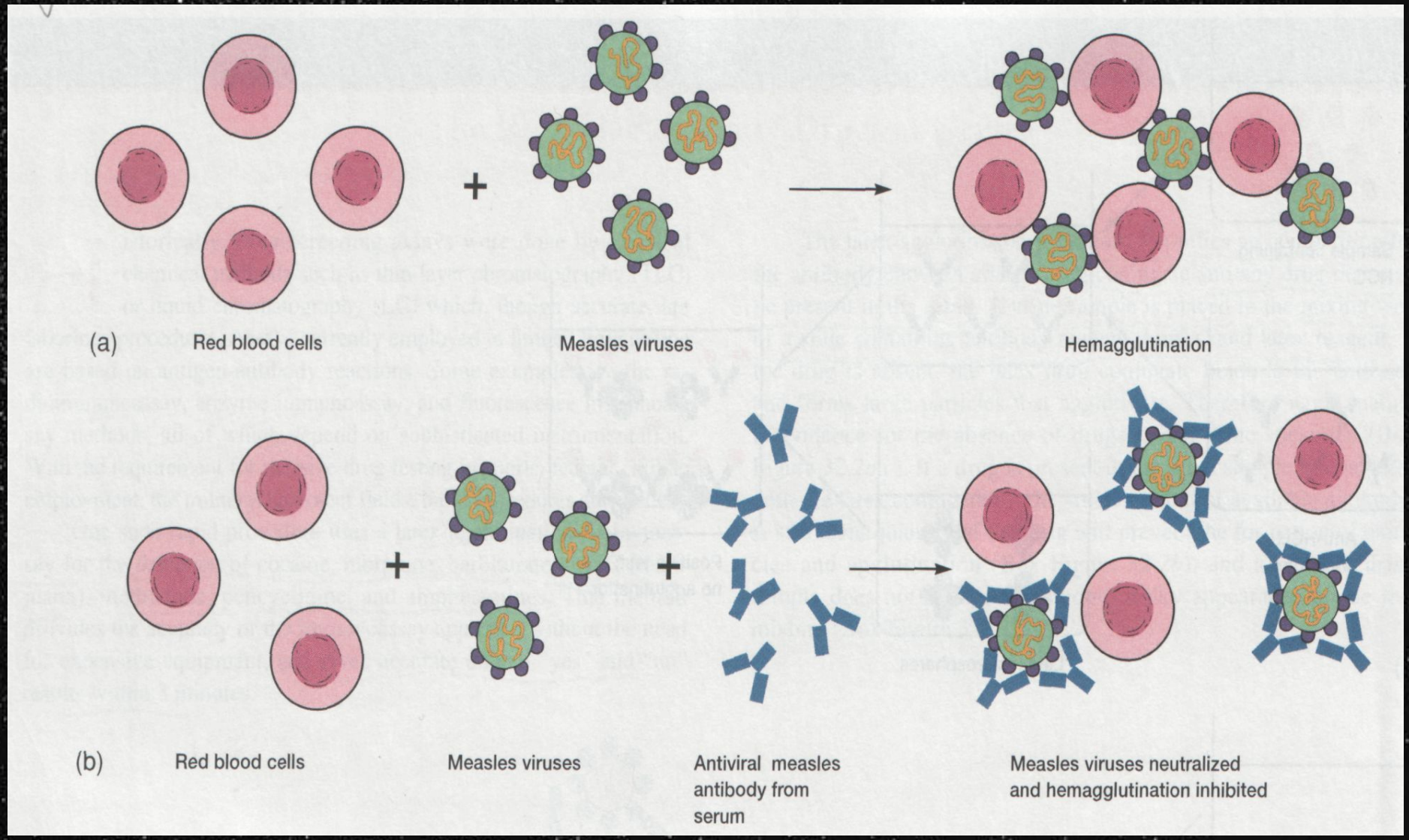
Реакция гемадсорбции — способность культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты.

- **Ідентифікація вірусів** – встановлення їх варіантної, видової, родової та родинної належності за допомогою діагностичних сироваток

- В основі лежить постановка серологічних реакцій

Методи ідентифікації вірусів

- Реакція нейтралізації (РН)
- Реакція гальмування гемадсорбції
- Реакція гальмування гемаглютинації


(a)
Red blood cells
Measles viruses
Hemagglutination
(b)
Red blood cells
Measles viruses
Antiviral measles antibody from serum
Measles viruses neutralized and hemagglutination inhibited

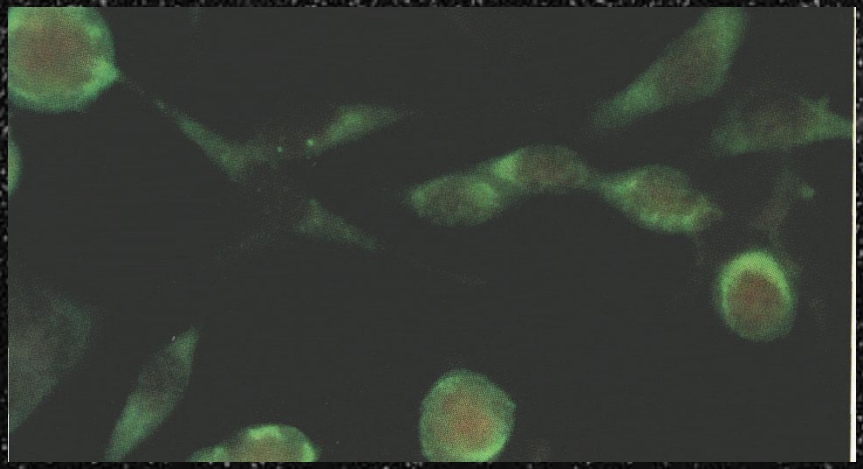
Методи ідентифікації вірусів

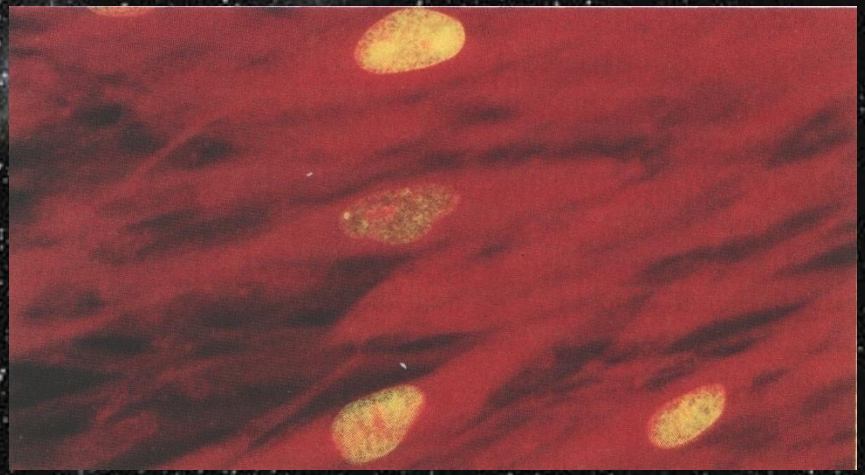
- Реакція непрямої гемаглютинації
- Реакція зв’язування комплементу (РЗК)
- Імуноферментний аналіз (ІФА)
- Радіоімунний аналіз

Методи ідентифікації вірусів

- Імунна електронна мікроскопія (ІЕМ)
- Реакція імунофлюоресценції (РІФ)
- Зустрічний імуноелектрофорез
- Метод молекулярної гібридизації НК

Імунофлюоресценція





Імунна електронна мікроскопія

- Застосовують для ідентифікації вірусів в дослідному матеріалі
- основана на виявленні імунних комплексів за допомогою електронного мікроскопу
- Матеріал змішують із специфічними сироватками, центрифугують.
- Утворені комплекси виявляють за допомогою електронної мікроскопії. Віруси, оточені молекулами специфічних імуноглобулінів мають вигляд вінка

Сучасні методи лабораторної діагностики вірусних захворювань

- **Мікроскопічні методи**

- цитоскопічний
- люмінісцентна мікроскопія
- електронна мікроскопія
- імунна електронна мікроскопія

- **Культуральний метод (вірусологічний)**

- **Серологічний метод** (РЗК, РГГА, РПГА, ІФА, РІА, імуноелектрофорез)

- **Молекулярно-генетичний метод**

- реакція гібридизації ДНК або РНК
- полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Етапи культурального (вірусологічного) методу в діагностиці вірусних інфекцій

- Забір матеріалу
- Обробка матеріалу антибіотиками з метою звільнення від супутньої бактеріальної мікрофлори
- Культивування вірусу (в культурах клітин, курячих ембріонах, в організмі лабораторних тварин)
- Індикація і титрування вірусу
- Ідентифікація (за антигенною структурою)

Молекулярно-біологічні методи

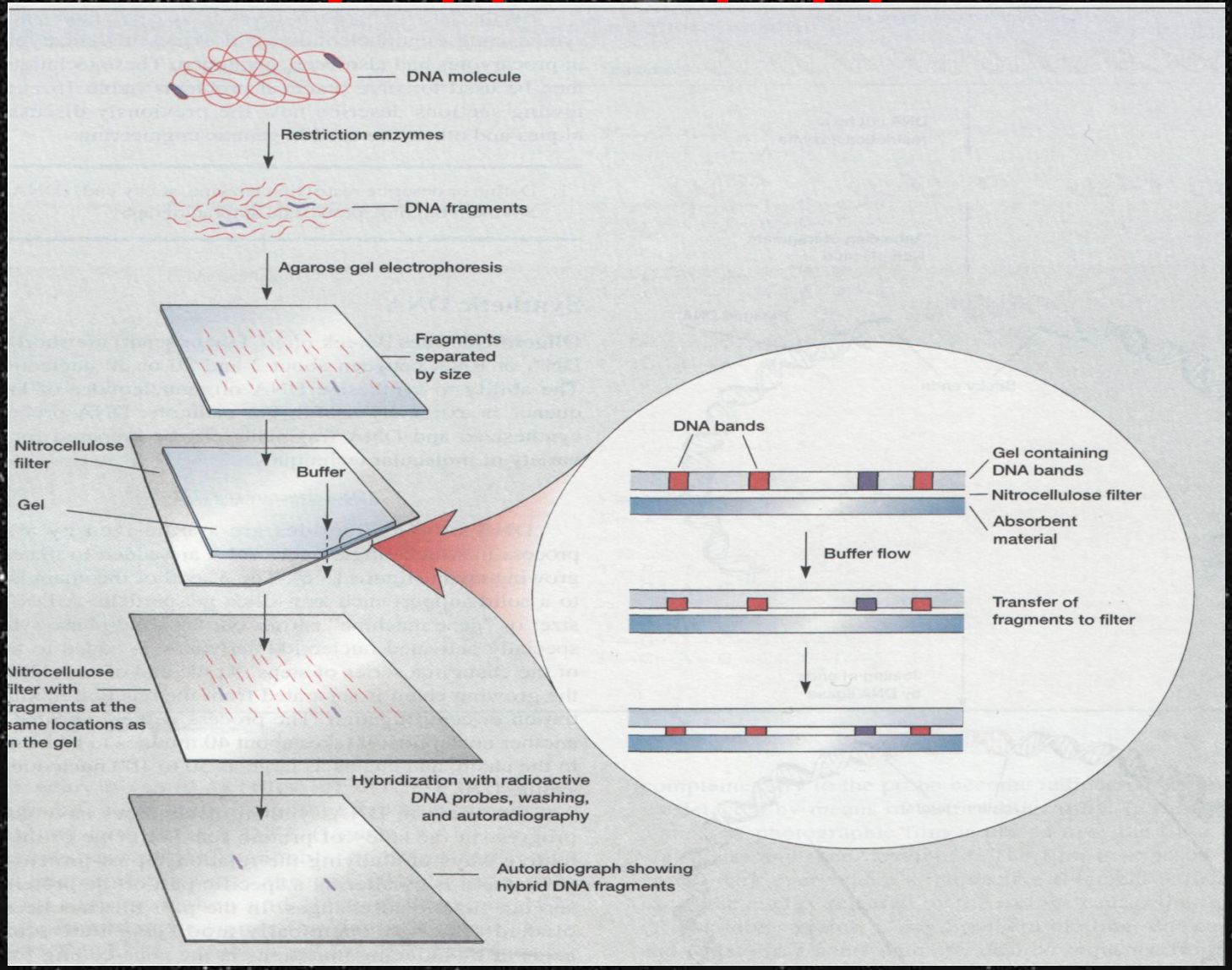
Рестрикційний метод

- Метод оснований на виявленні в інфекційному матеріалі специфічних фрагментів ДНК (РНК) збудника
- Інфекційний матеріал, в якому передбачається знаходження ДНК збудника, обробляють рестрикційними ферментами-ендонуклеазами, які розрізають ДНК на окремі фрагменти.
- Після цього проводять аналіз отриманих фрагментів, які є унікальними для кожного виду мікроорганізму методом гібридизації з міченими ДНК-зондами

Гібридизація нуклеїнових кислот

- Метод оснований на виявленні в інфекційному матеріалі ділянок ДНК, характерних для збудника, шляхом їх гібридизації з діагностичними ДНК-зондами
- ДНК-зонди є однонитковими фрагментами ДНК (комплементарні специфічним ділянкам ДНК збудника), які мічені радіонуклідами, ферментами або флюорохромом

Метод молекулярної гібридизації ДНК



Полімеразна ланцюгова реакція

- Метод оснований на виявленні в інфекційному матеріалі специфічних фрагментів ДНК або РНК збудника шляхом його нарощування (ампліфікації)

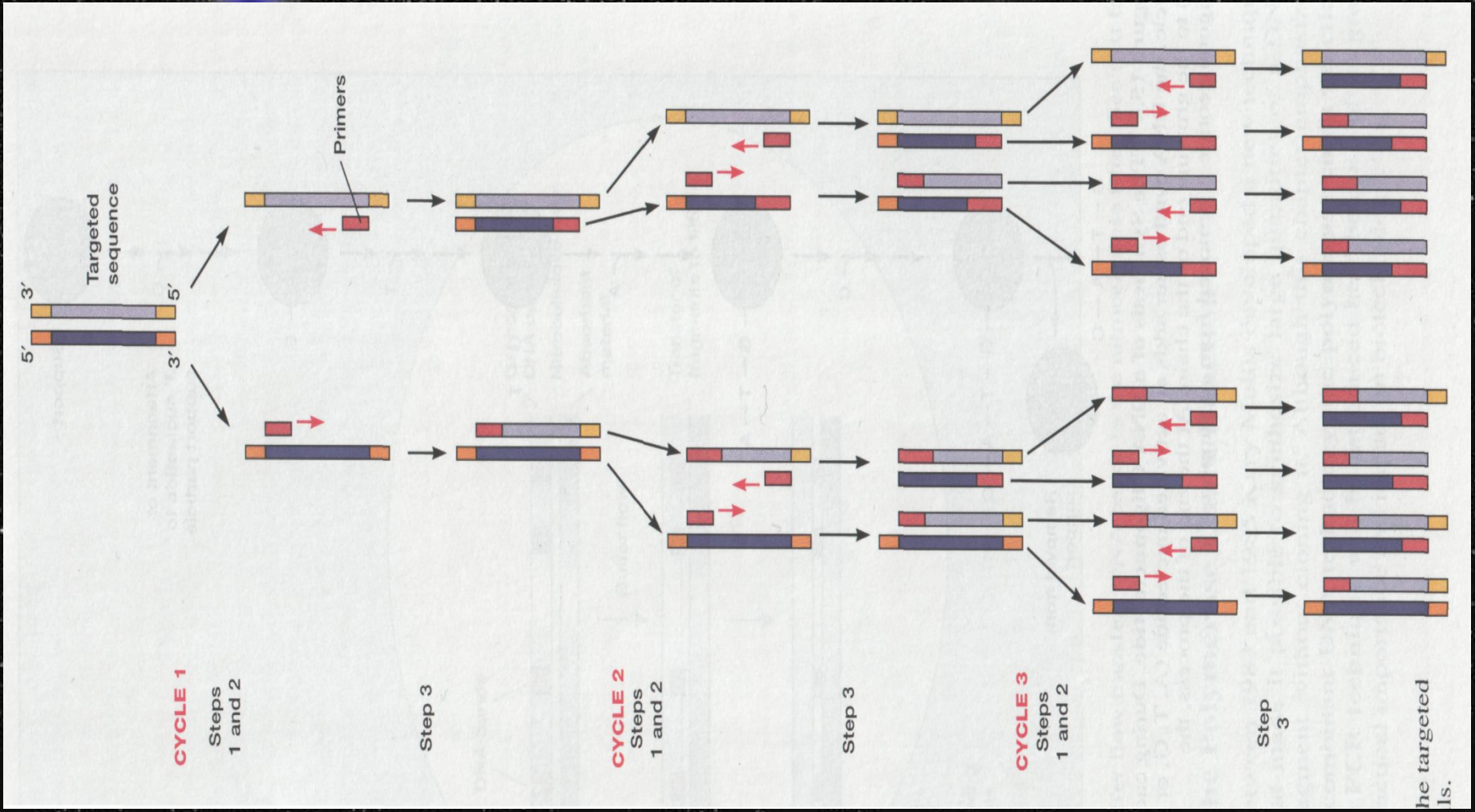
- **Використовують:**
- Для ідентифікації збудників
- Для ідентифікації особистостей
- Для встановлення родинного походження
- Виявлення генів спадкових хвороб

Етапи дослідження:

- ДНК термічно обробляють при 94^0С протягом 15 сек для розділення на окремі ланцюги, охолоджують
- До досліджуваного матеріалу вносять праймери (діагностичні специфічні зонди-олігонуклеотиди), комплементарні кінцям специфічного фрагмента геному)

- Разом з праймерами додають термостабільну **ДНК-полімеразу**, яка запускає утворення вторинних копій ланцюгів ДНК (60 сек, 68^0С)
- Утворені ланцюги знову нагрівають, маніпуляції повторюють (20-50 циклів)
- В результаті отримують велику кількість копій, які ідентифікують за допомогою електрофорезу **(молекулярної гібридизації)**

Полімеразна ланцюгова реакція



Бактеріофаги

Бактеріофаги – це віруси, що репродукуються в клітинах бактерій

Розрізняють:

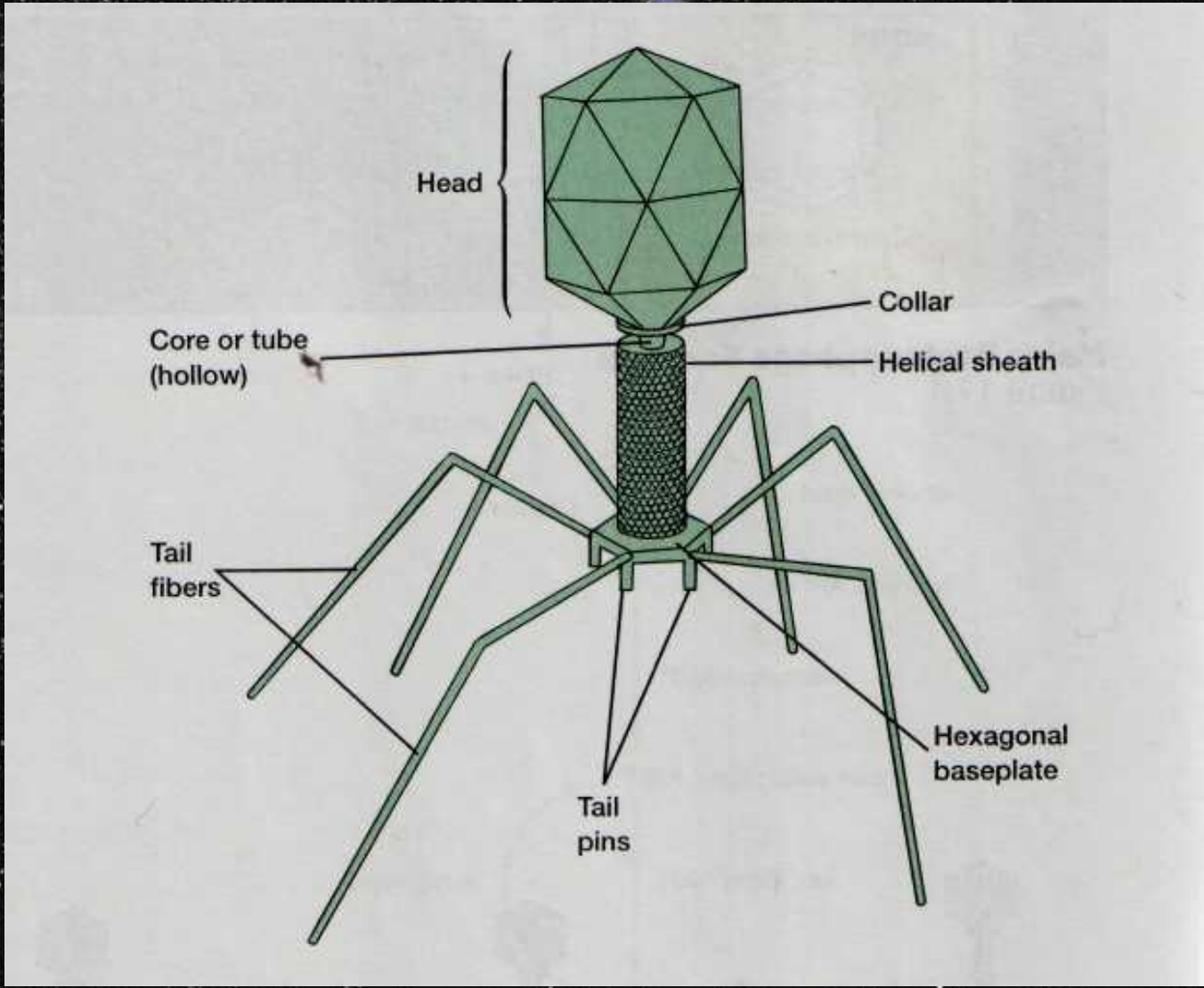
- **За вірулентністю**

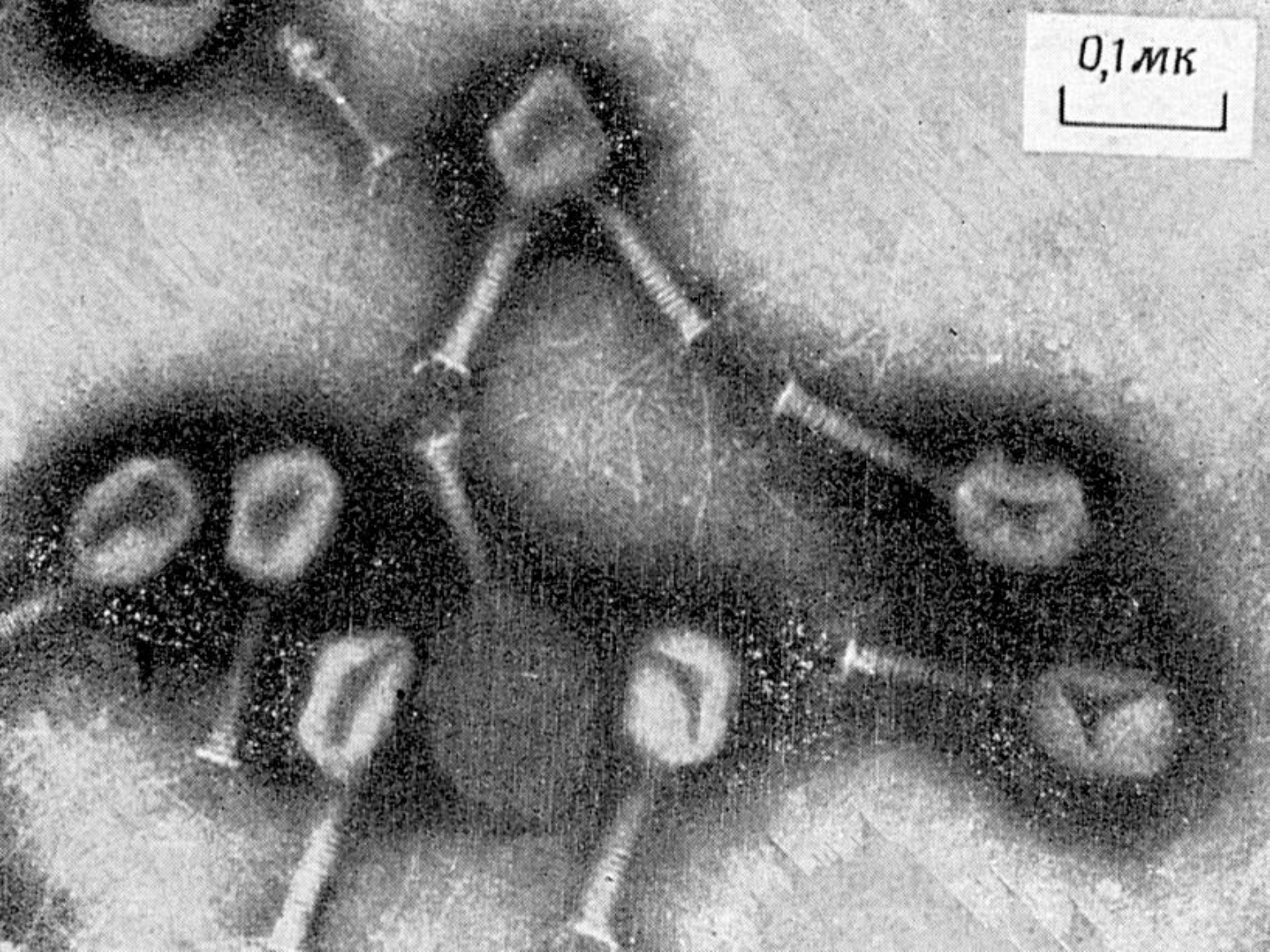
- вірулентні (спричиняють лізис клітини)
- помірні (інтегрують ДНК в геном, співіснують з клітиною в формі профага)

- **За спектром дії**

- полівалентні (інфікують бактерії одного роду)
- моновалентні (інфікують бактерії одного виду)
- типоспецифічні (інфікують бактерії певного варіанту одного виду)

Будова бактеріофага



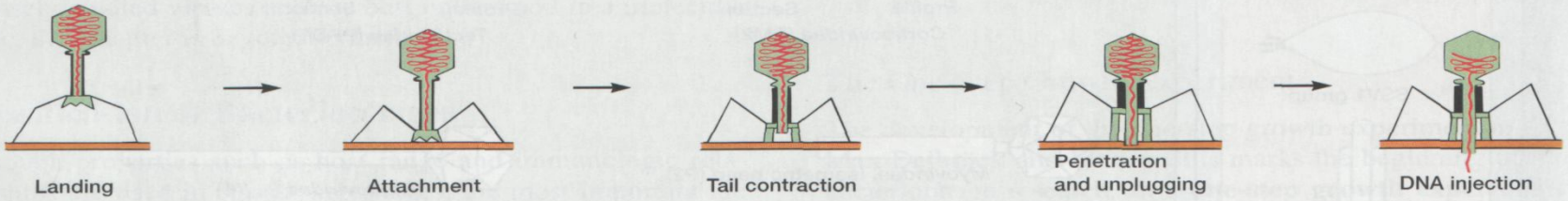

0,1 мк

Морфологічні групи бактеріофагів

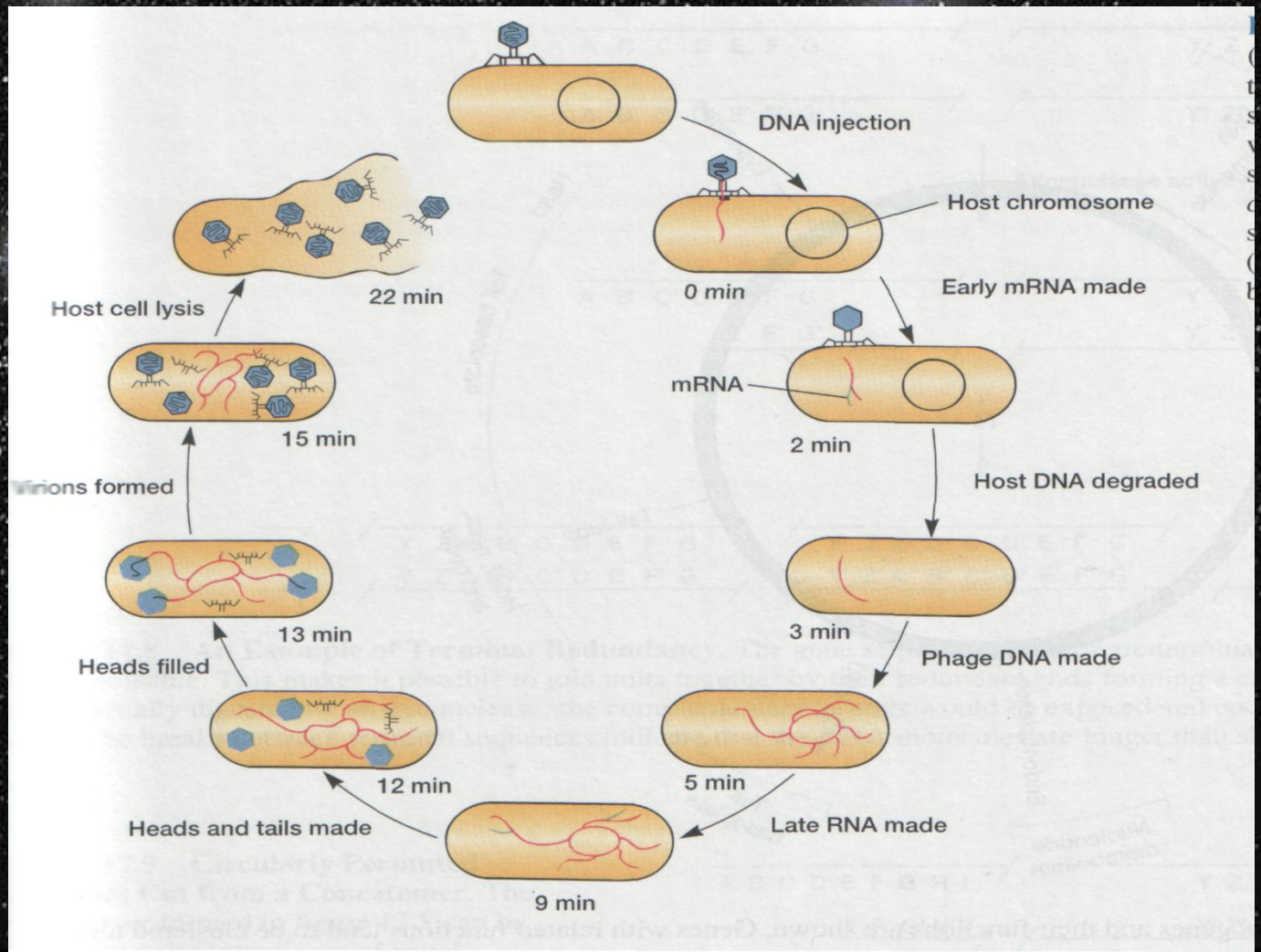
- Ниткоподібні фаги
- Голівчасті з рудиментарним відростком
- Голівчасті з коротким відростком
- Голівчасті з нескорочувальним відростком
- Голівчасті з скорочувальним відростком і базальною пластинкою

Етапи репродукції бактеріофагів

- **Адсорбція**
- **Проникнення** (ін‘єктування нуклеїнової кислоти)
- **Репродукція**
- **Зборка** вірусних фаговів у цитоплазмі бактерій
- **Вихід** фагових частинок із клітини після її лізису
- Помірні бактеріофаги завершують репродукцію на етапі інтеграції нуклеїнової кислоти в геном клітини-хазяїна



gure 17.3 T4 Phage Adsorption and DNA Injection.



Стадії взаємодії помірного фага з чутливою клітиною

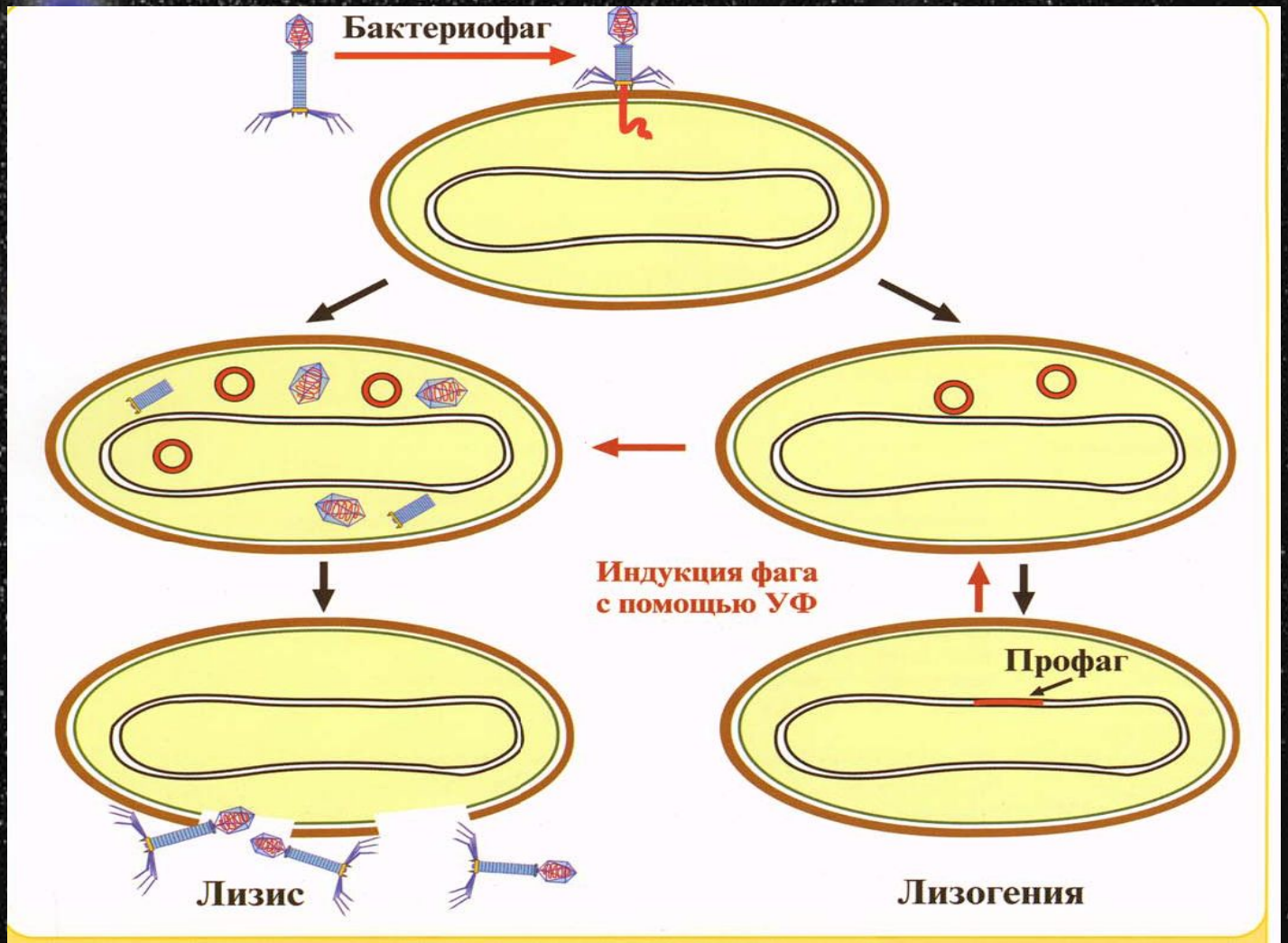


Рис. 4.19. Пути развития умеренного фага лямбда

Використання фагів

Моновалентні вірулентні фаги використовують для:

- Лікування і профілактики інфекцій
- Видової ідентифікації в діагностиці інфекцій
- Фаготипування епідемічних штамів збудників

Помірні фаги використовують:

- В генній інженерії для генетичних рекомбінацій
- Для отримання лізогенних культур-індикаторів мутагенних факторів