A hand holding a black pen over a document, with a microscope in the foreground. The background is blurred, showing a person's arm and a wall.

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 прокариотів 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 оболонки
 2. **Провірус** – нуклеїнова кислота, інтегрована в геном клітини-хазяїна

Віруси поділяються на канонічні та неканонічні

Неканонічні віруси

Віруссоїди – 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 – однопіткові 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

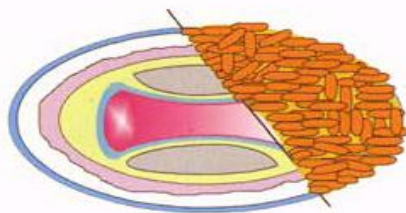
ДНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Herpesviridae



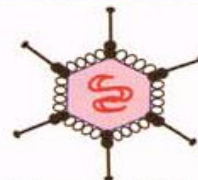
Неpadnaviridae



Poxviridae

ВИРУСЫ БЕЗ ОБОЛОЧКИ

ДНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Adenoviridae



Polyomaviridae
Papillomaviridae

ДНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Parvoviridae

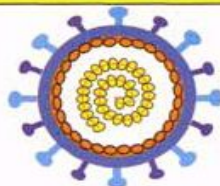


Circinoviridae

РНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



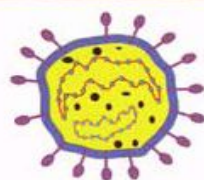
Coronaviridae



Paramyxoviridae



Bunyaviridae



Arenaviridae

РНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Reoviridae

РНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Picornaviridae



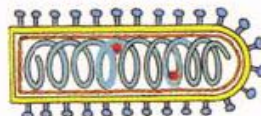
Caliciviridae



Orthomyxoviridae



Retroviridae



Rhabdoviridae



Togaviridae



Flaviviridae



Filoviridae

Рис. 4.6. Классификация и морфология вирусов

- Капсиди можуть бути побудовані за різними типами симетрії:

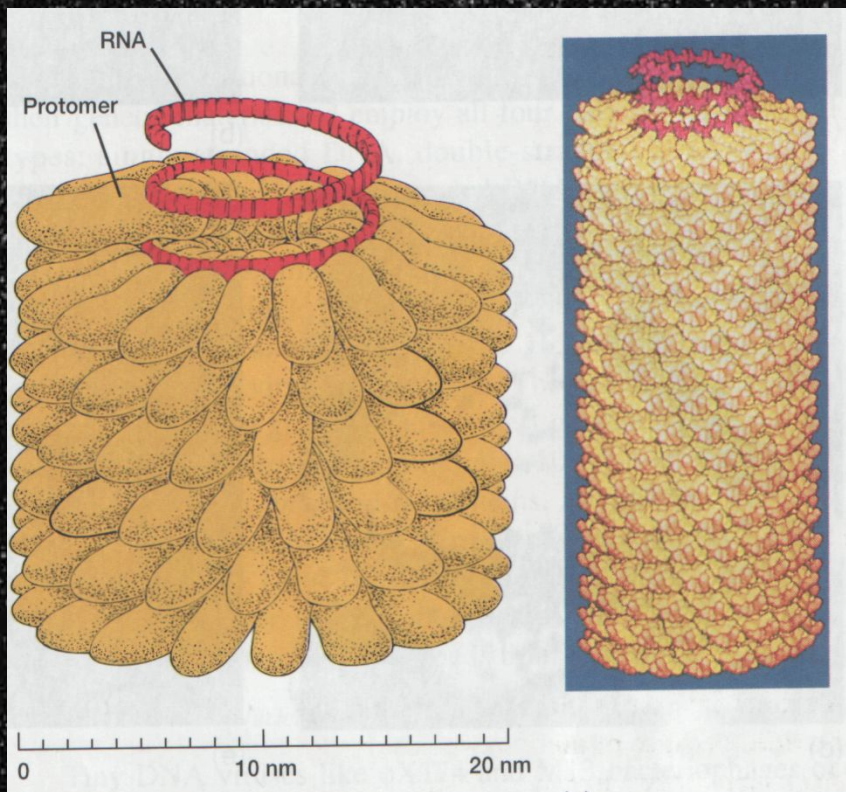
1. Спіральним

2. Кубічним (ікосаедральним)

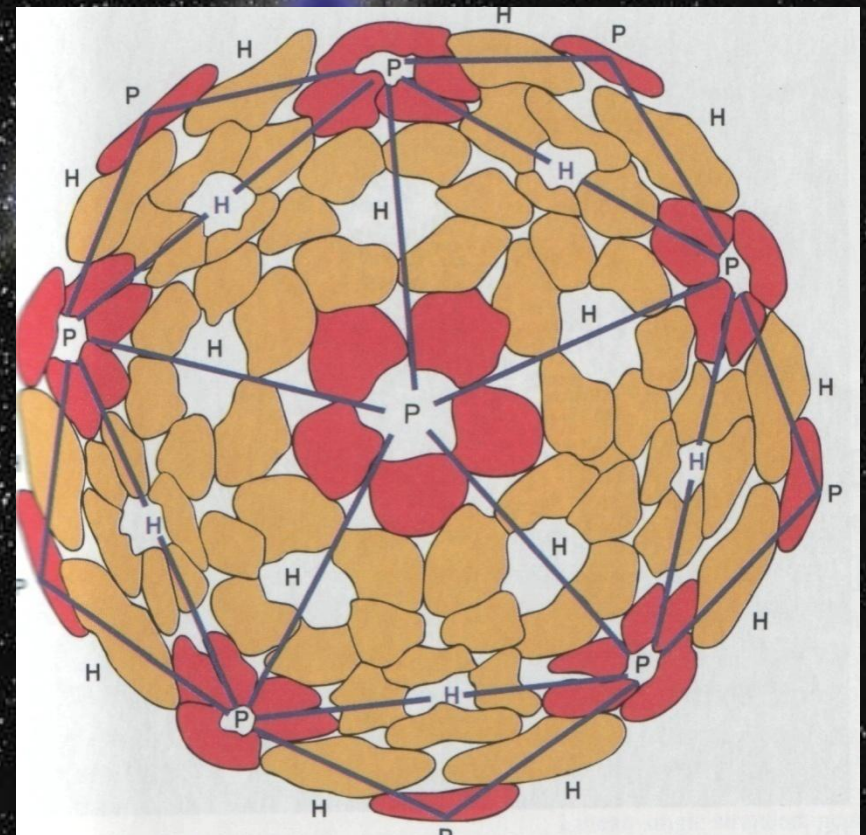
3. Змішаним

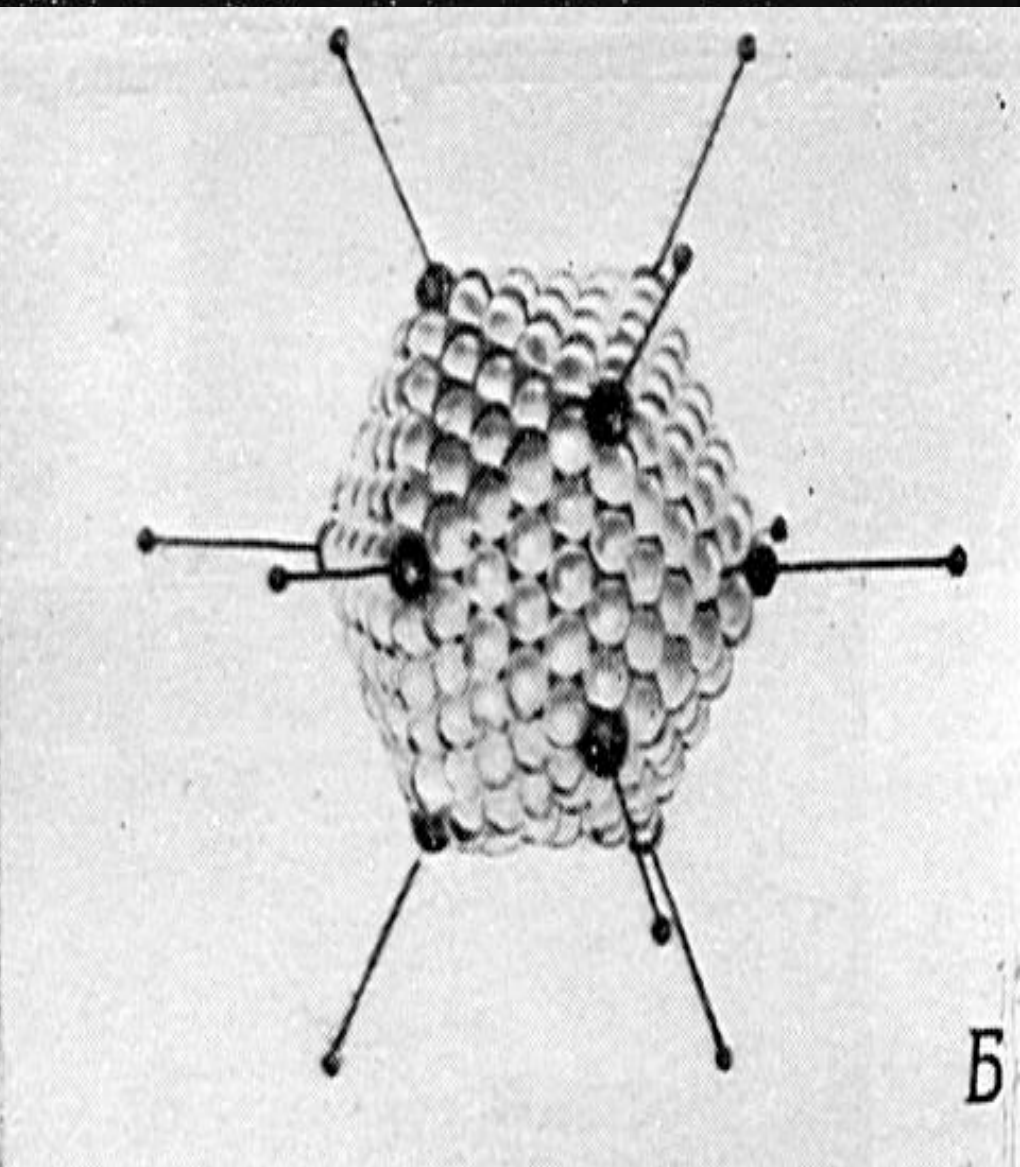
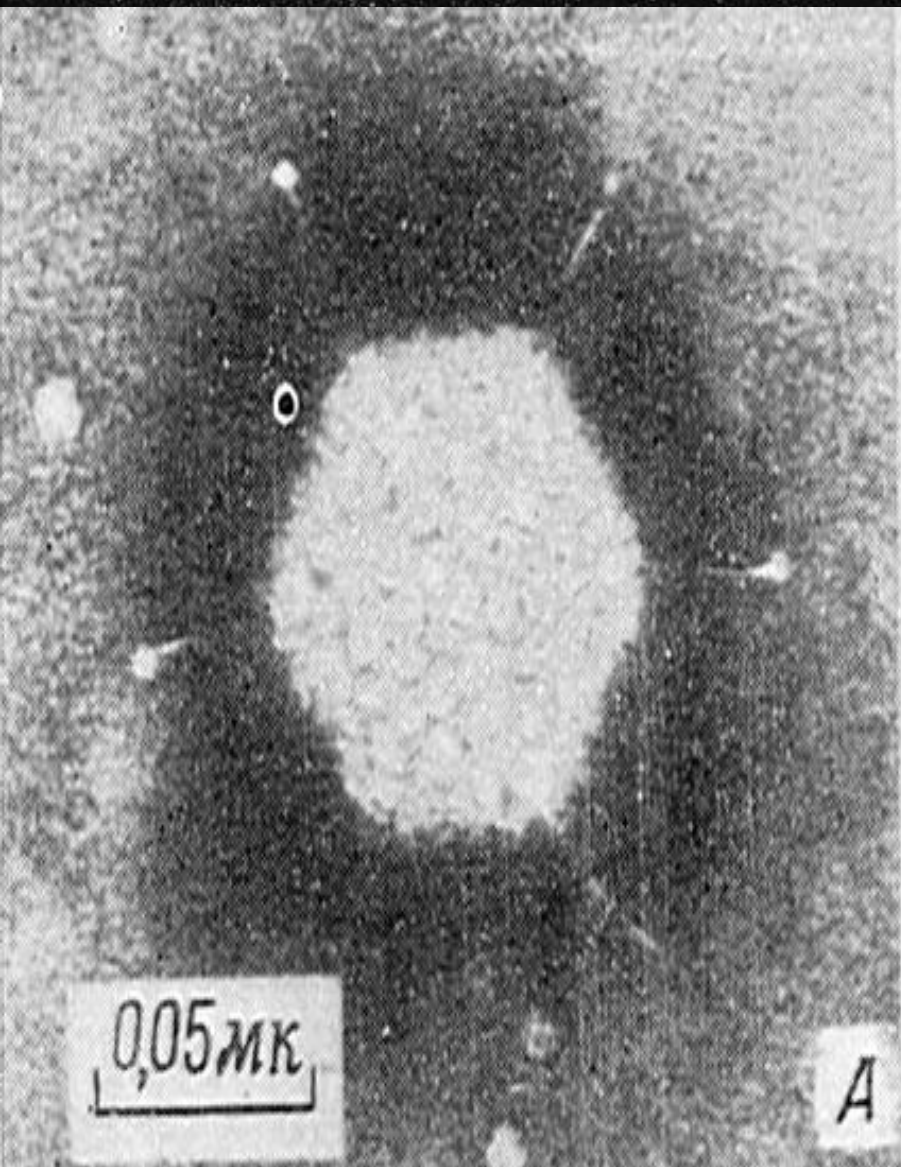
Типи вірусної симетрії

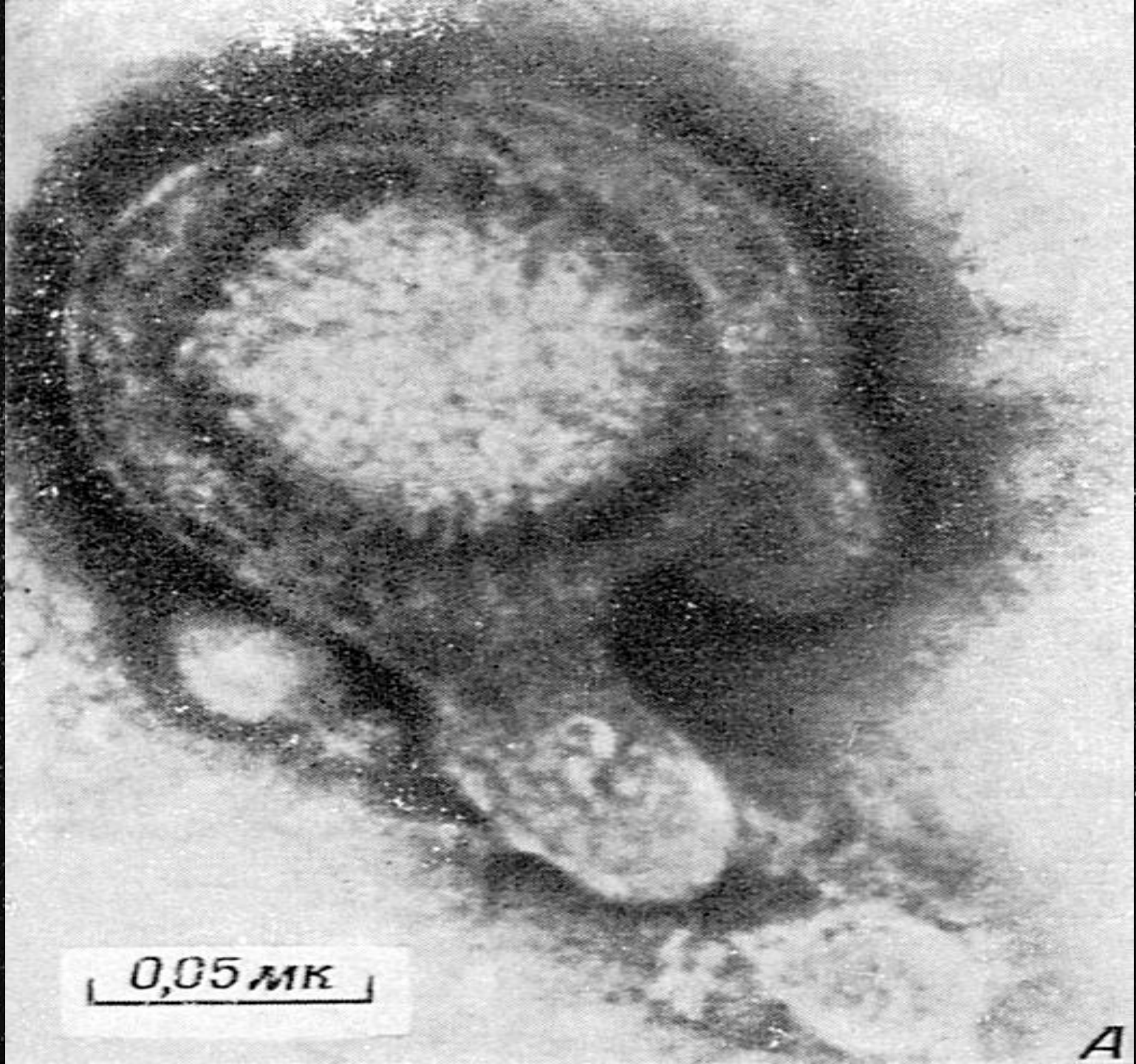
Спіральний тип



Кубічний тип

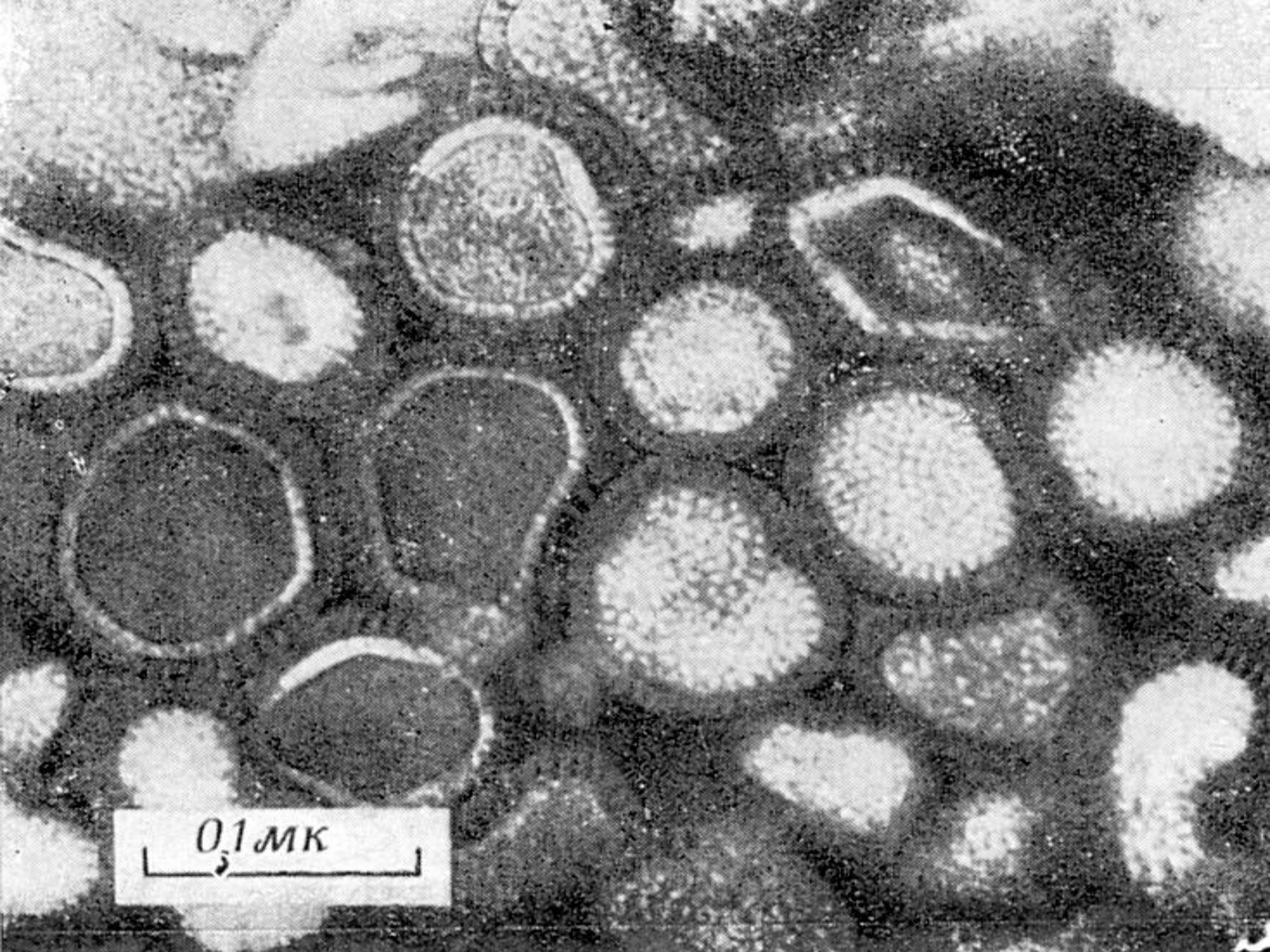






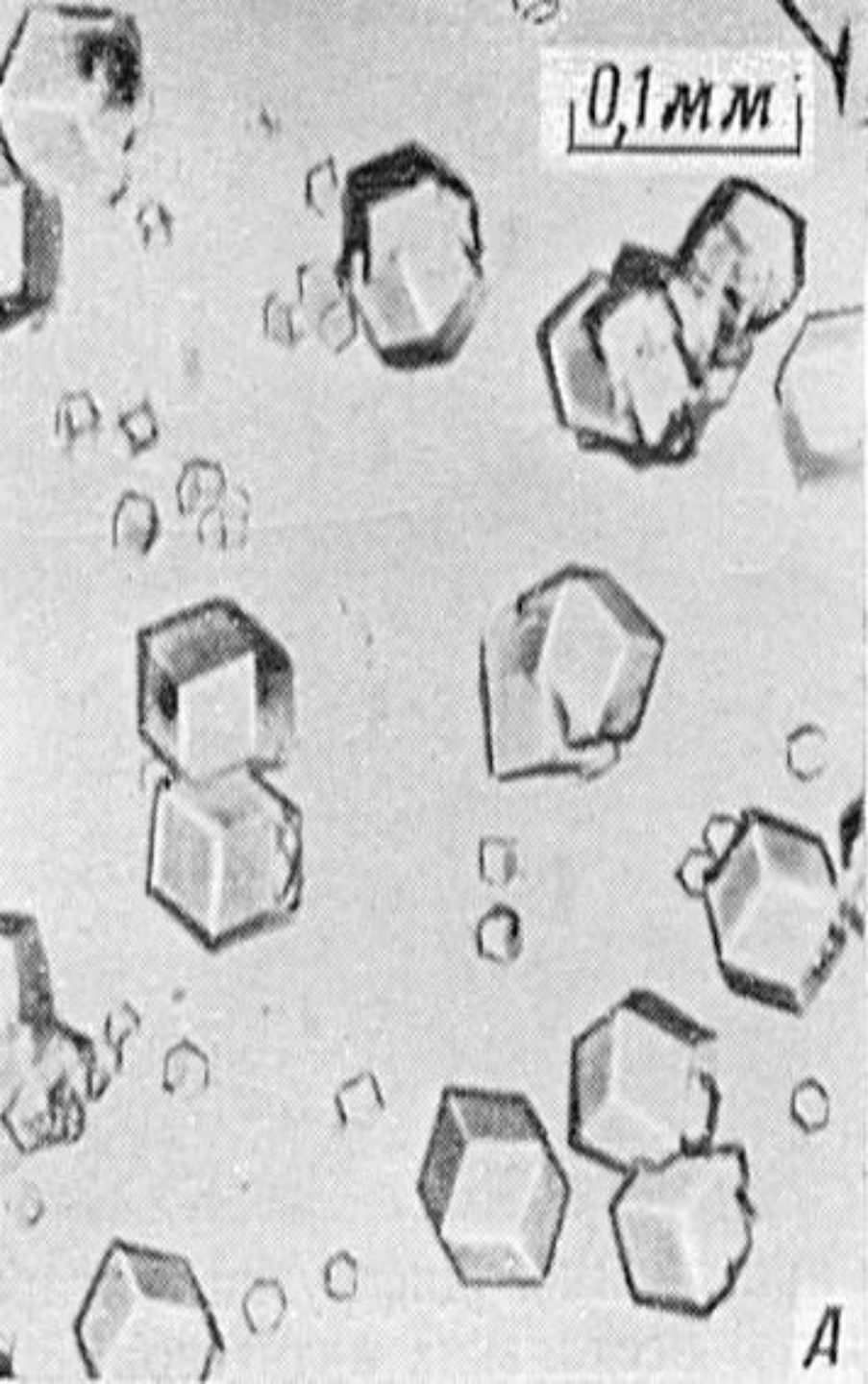
0,05 MK

A



0,1 MK





Етапи репродуктивного циклу вірусів

- **Адсорбція**

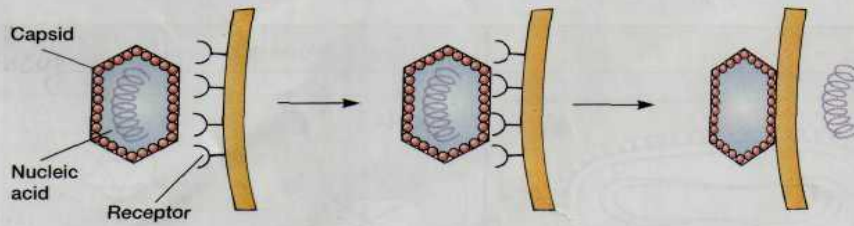
1. Фаза неспецифічної адсорбції – обумовлена електростатичними силами (зворотня)
2. Фаза специфічної адсорбції (рецепторна)

• Пенетрація

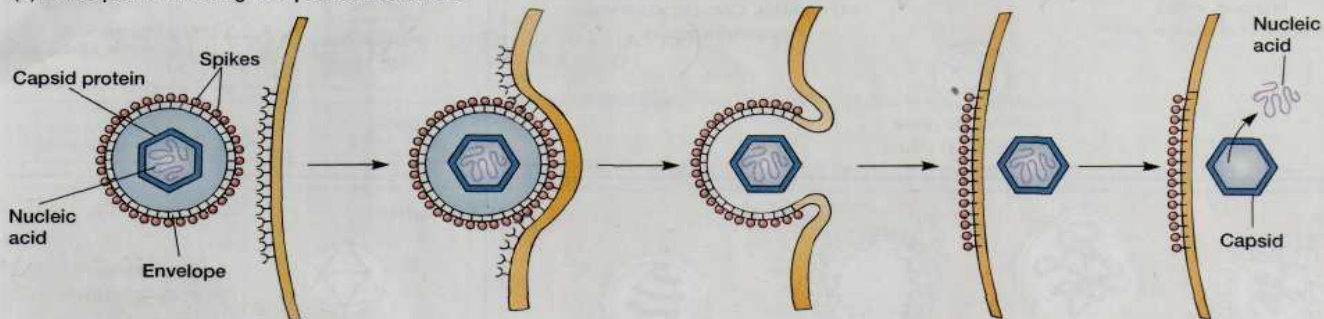
- **віропексис (рецепторний ендоцитоз)**
 - прості, складні віруси
- **злиття мембран** – складні віруси
- **пряме проникнення** – прості віруси, які мають здатність проривати клітинну оболонку
- **трансфекція** – проникнення вільної нуклеїнової кислоти
- **інокуляція** – спосіб проникнення бактеріофагів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

Способи проникнення вірусів

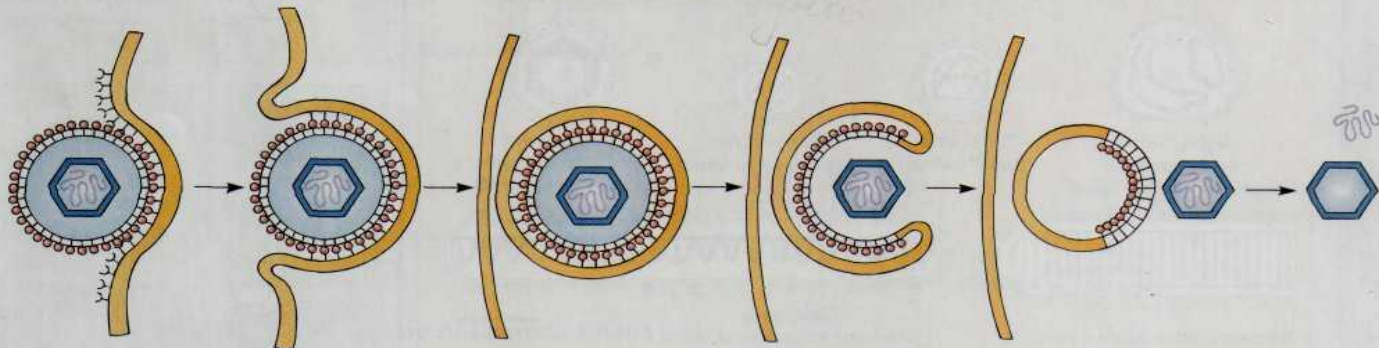
(a) Direct penetration by naked viruses



(b) Enveloped virus fusing with plasma membrane



(c) Entry of enveloped virus by endocytosis

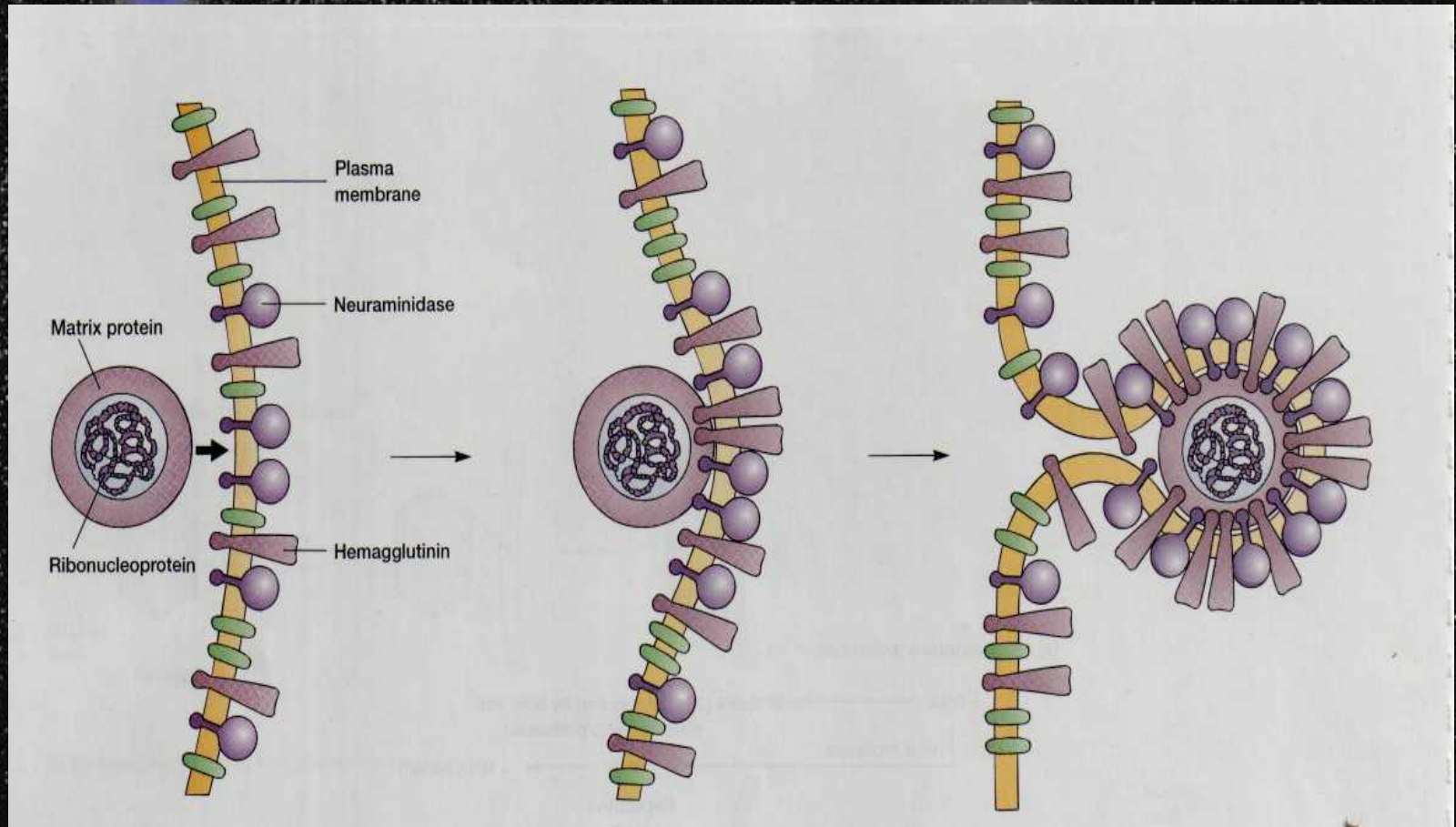


- **Дезінтеграція (депротеїнізація)**- відбувається вивільнення нуклеїнової кислоти віріону із оболонки, які руйнуються лізосомальними ферментами клітини-мішені
- **Диз'юнктивна репродукція**
 - транскрипція (синтез інформаційної РНК)
 - трансляція (синтез вірусоспецифічних ферментів і вірусних структурних 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 вірусу (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 віруса

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 рН 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

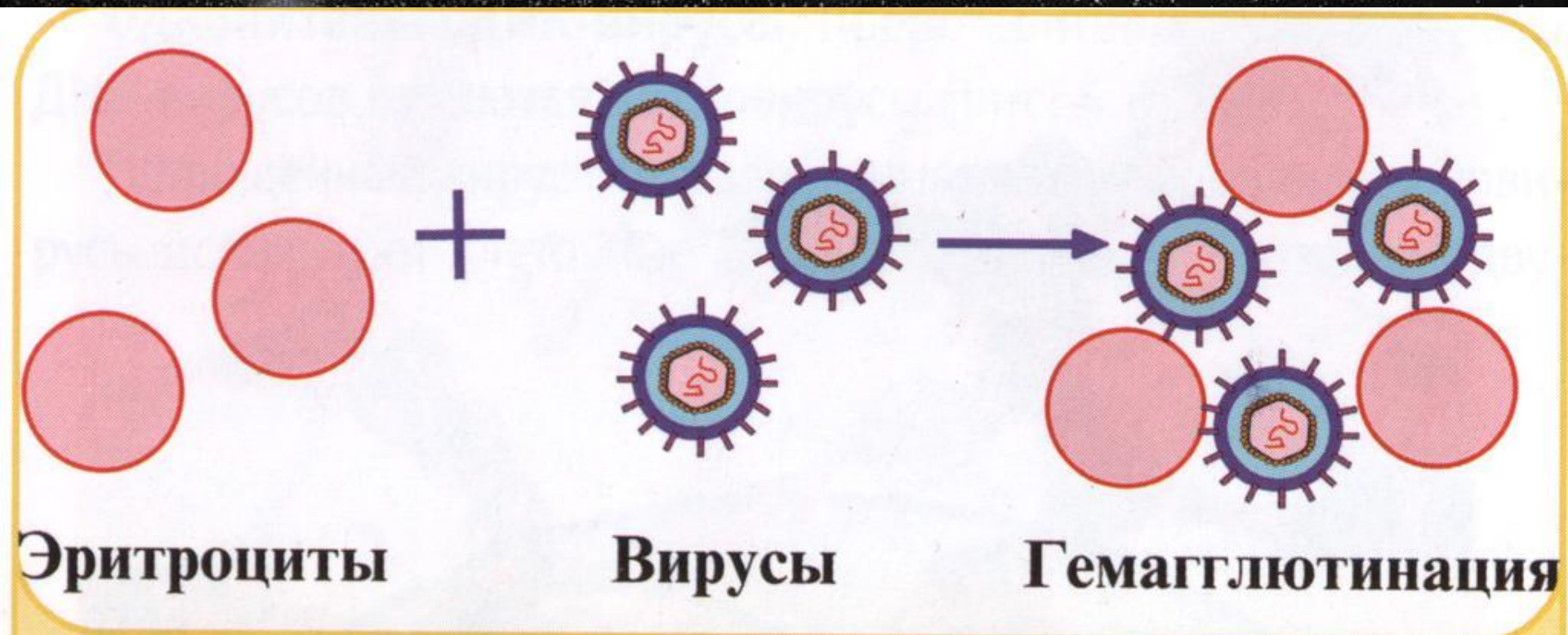


Рис. 4.15. Схема реакции гемагглютинации

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

Індикація вірусів

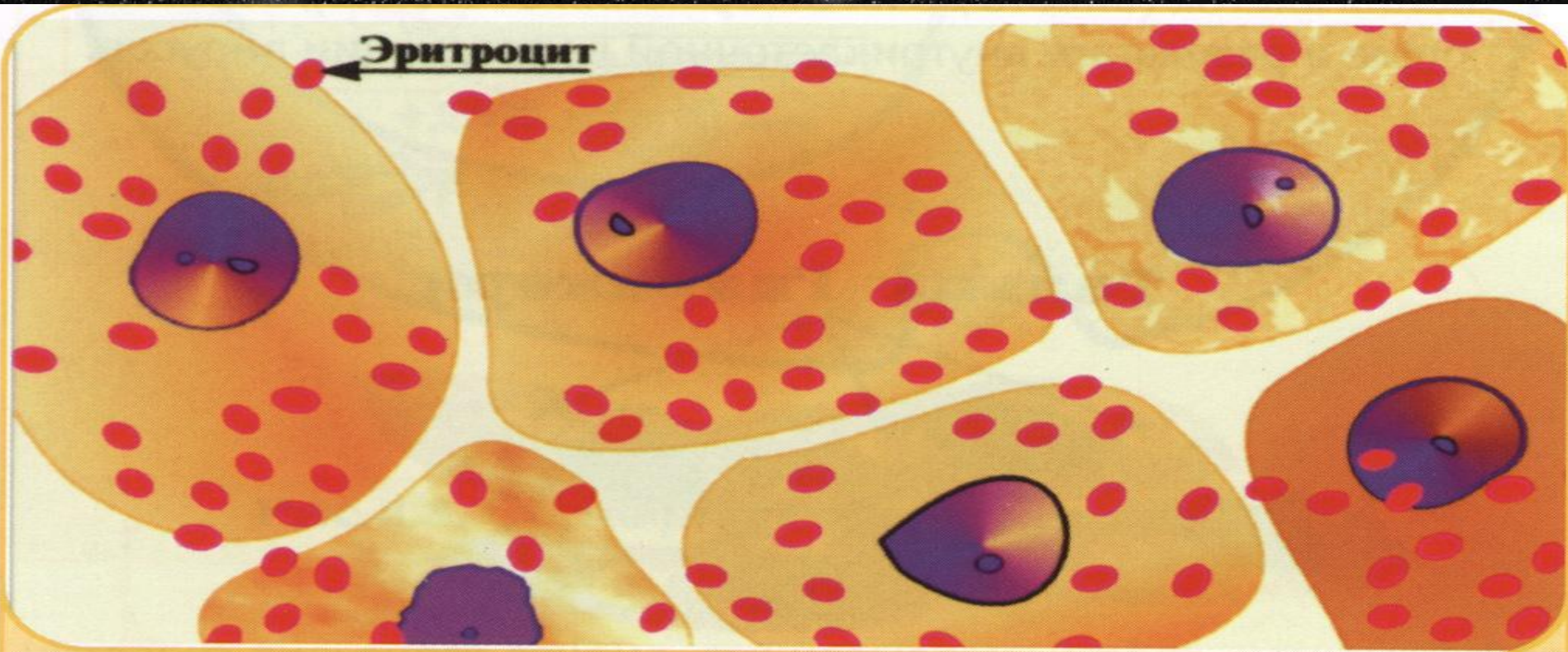


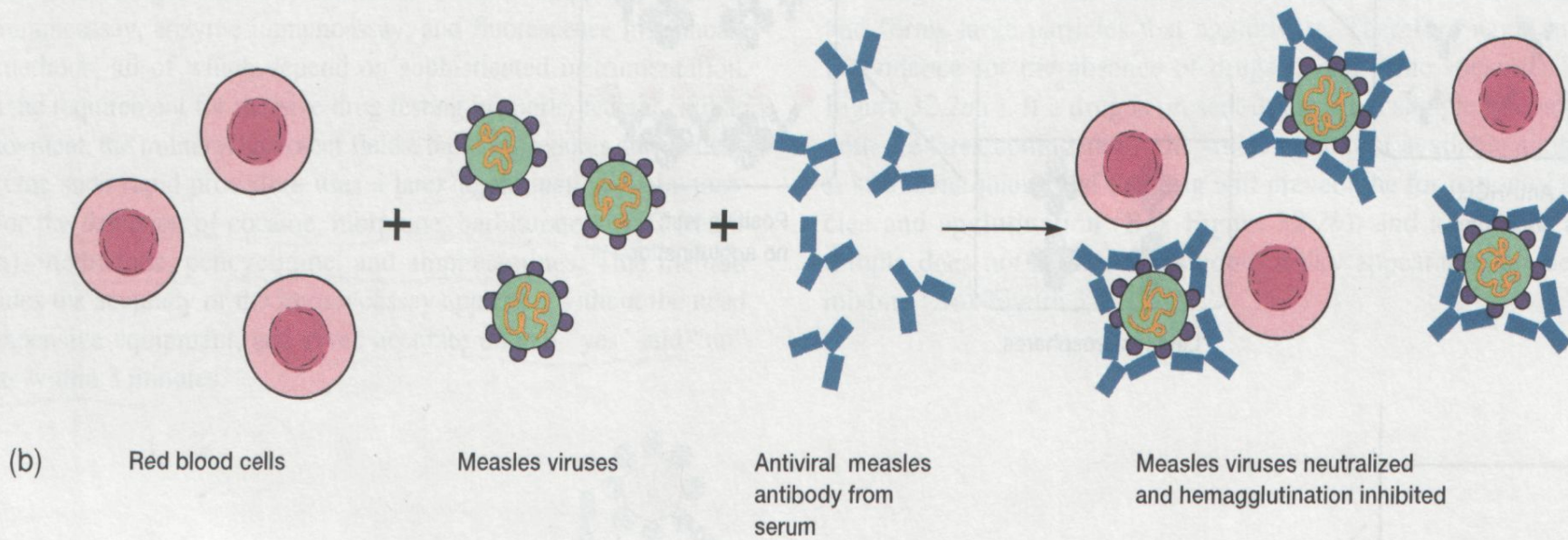
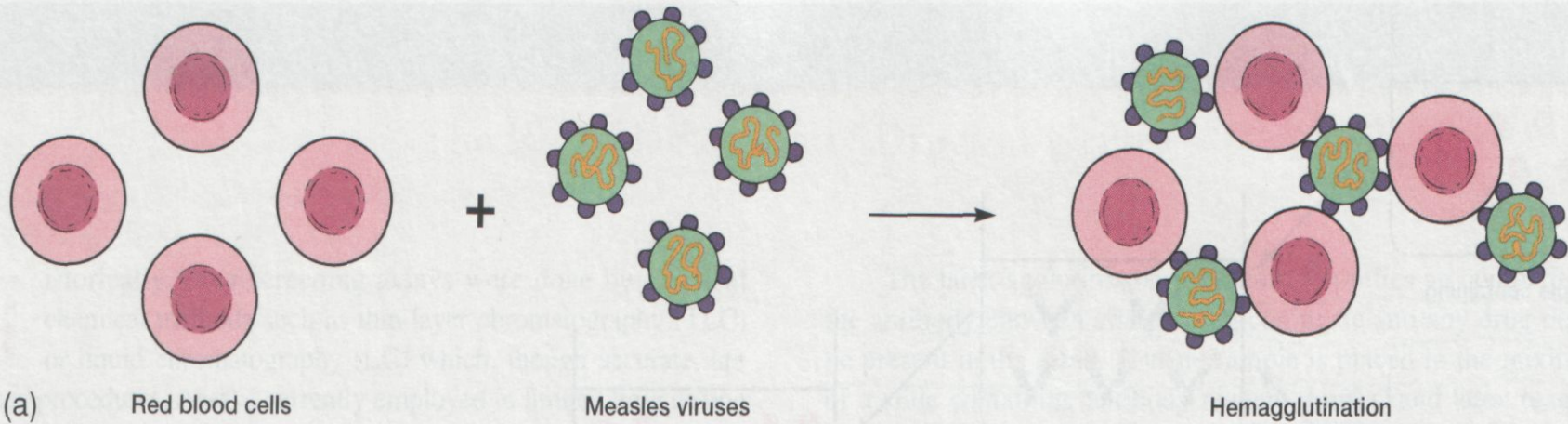
Рис. 4.16. Реакция гемадсорбции

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



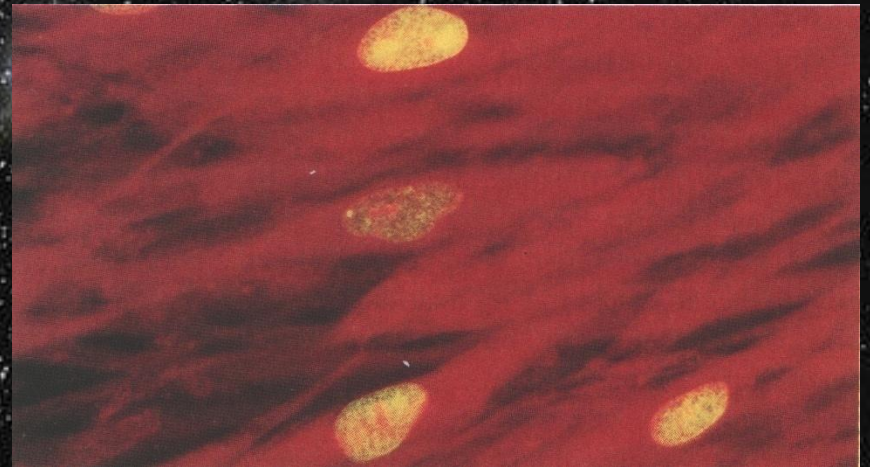
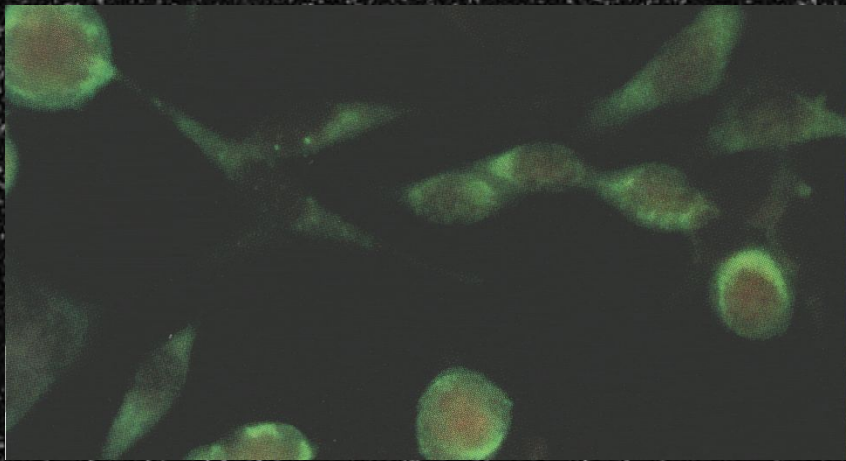
Методи ідентифікації вірусів

- Реакція непрямой гемаглютинації
- Реакція зв'язування комплементу (РЗК)
- Імуноферментний аналіз (ІФА)
- Радіоімуний 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 **імуних 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

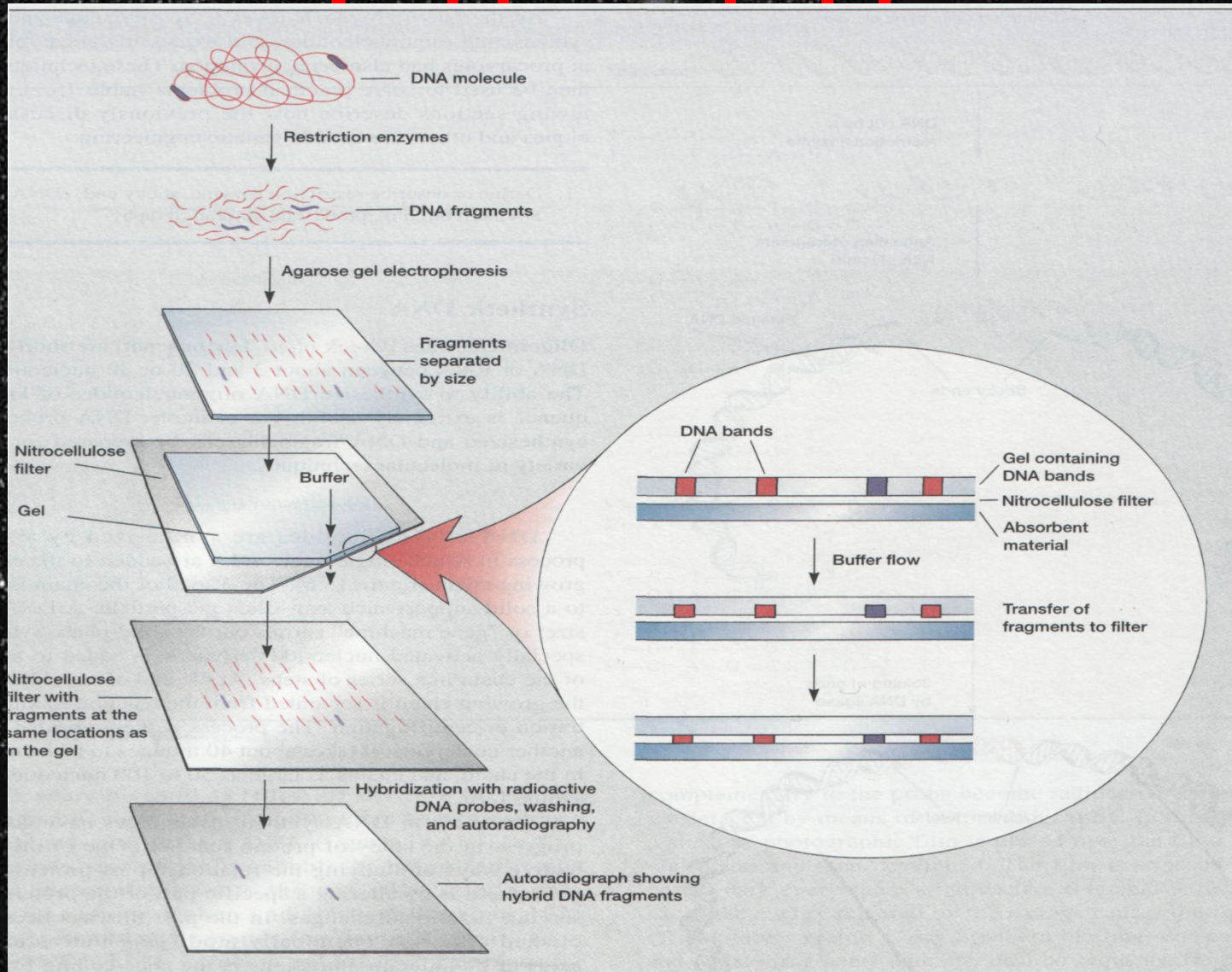
Рестрикційний метод

- 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 однопіткковими фрагментами ДНК (комплементарні специфічним ділянкам ДНК збудника), які мічені радіонуклідами, ферментами або флюорохромом

Метод молекулярної гібридації ДНК



Полімеразна ланцюгова реакція

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

- **Використовують:**

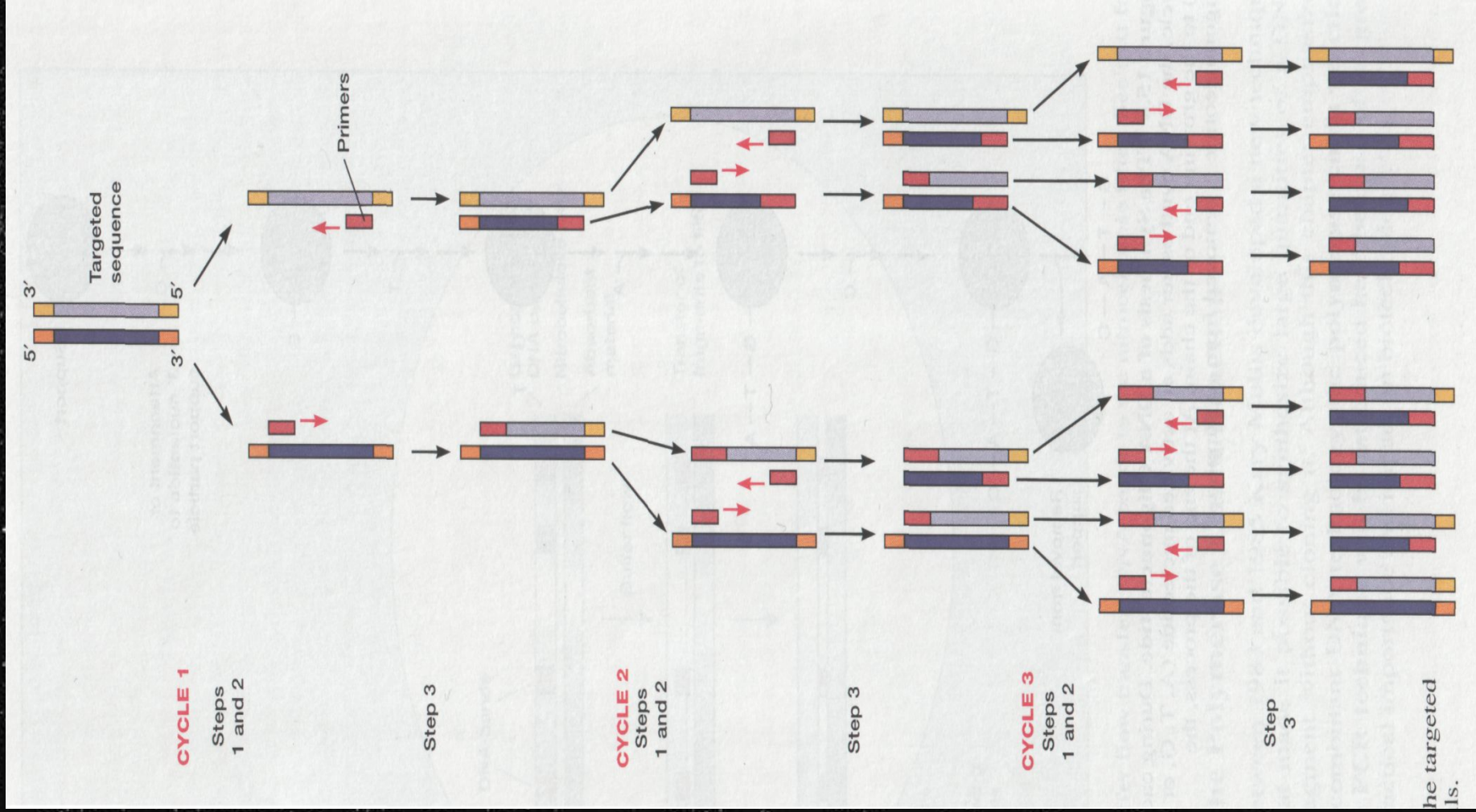
- Для ідентифікації збудників
- Для ідентифікації особистостей
- Для встановлення родинного походження
- Виявлення генів спадкових хвороб

Етапи дослідження:

- ДНК термічно обробляють при **94⁰С 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, 68⁰С)
- 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



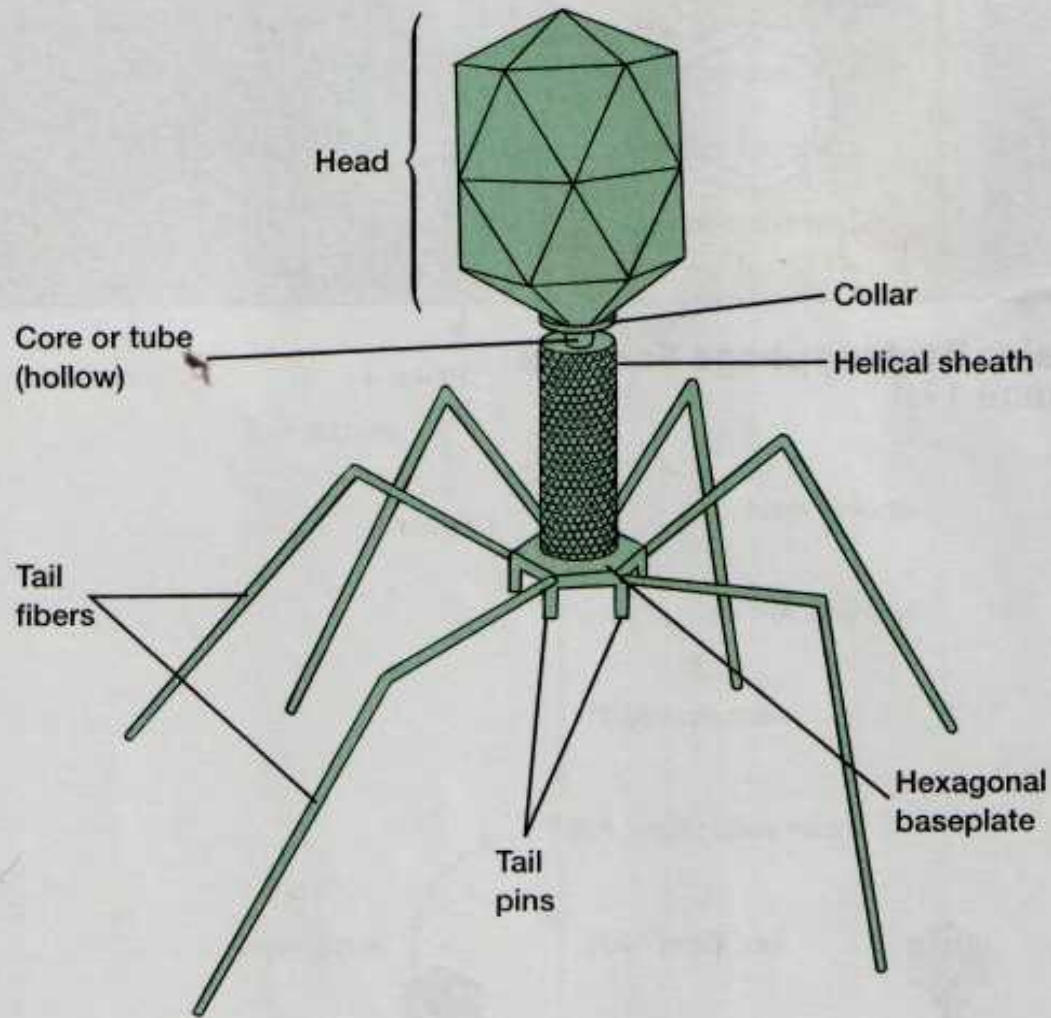
Бактеріофаги

Бактеріофаги – це віруси, що репродукуються в клітинах бактерій

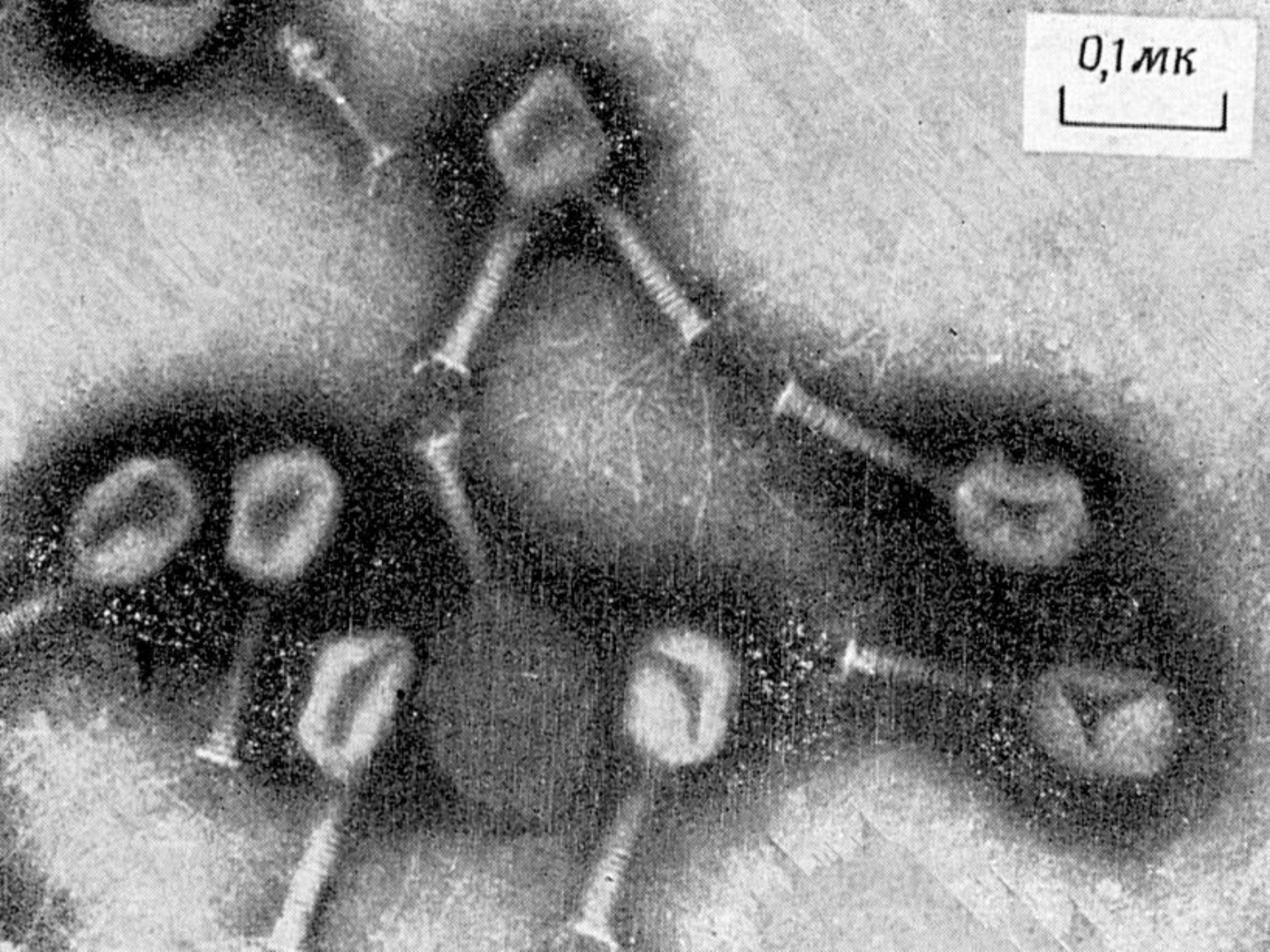
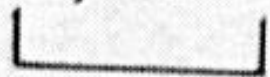
Розрізняють:

- **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

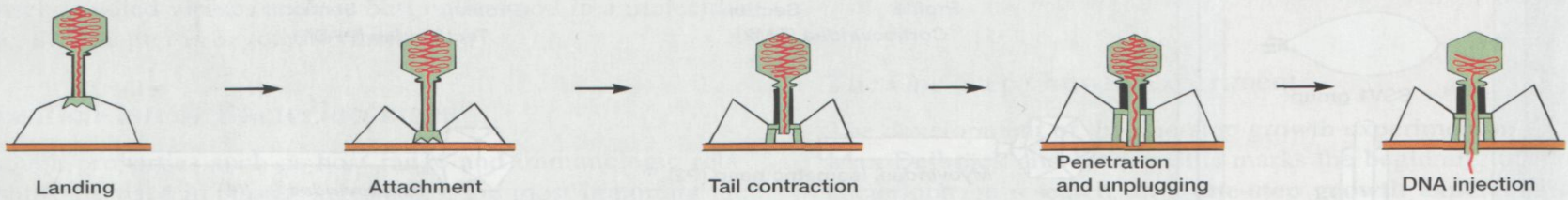
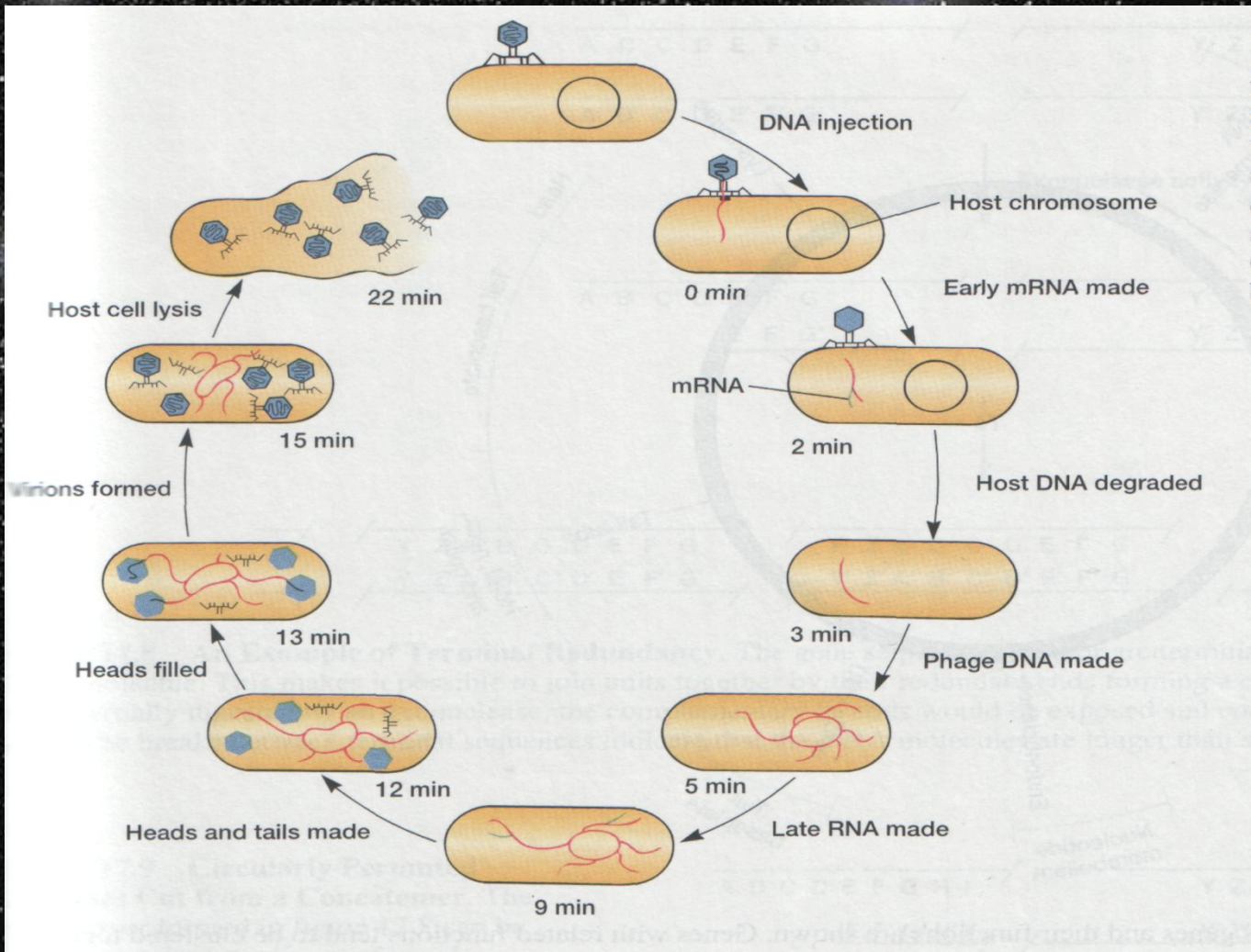


Figure 17.3 T4 Phage Adsorption and DNA Injection.



Стадії взаємодії помірнього фага з чутливою клітиною

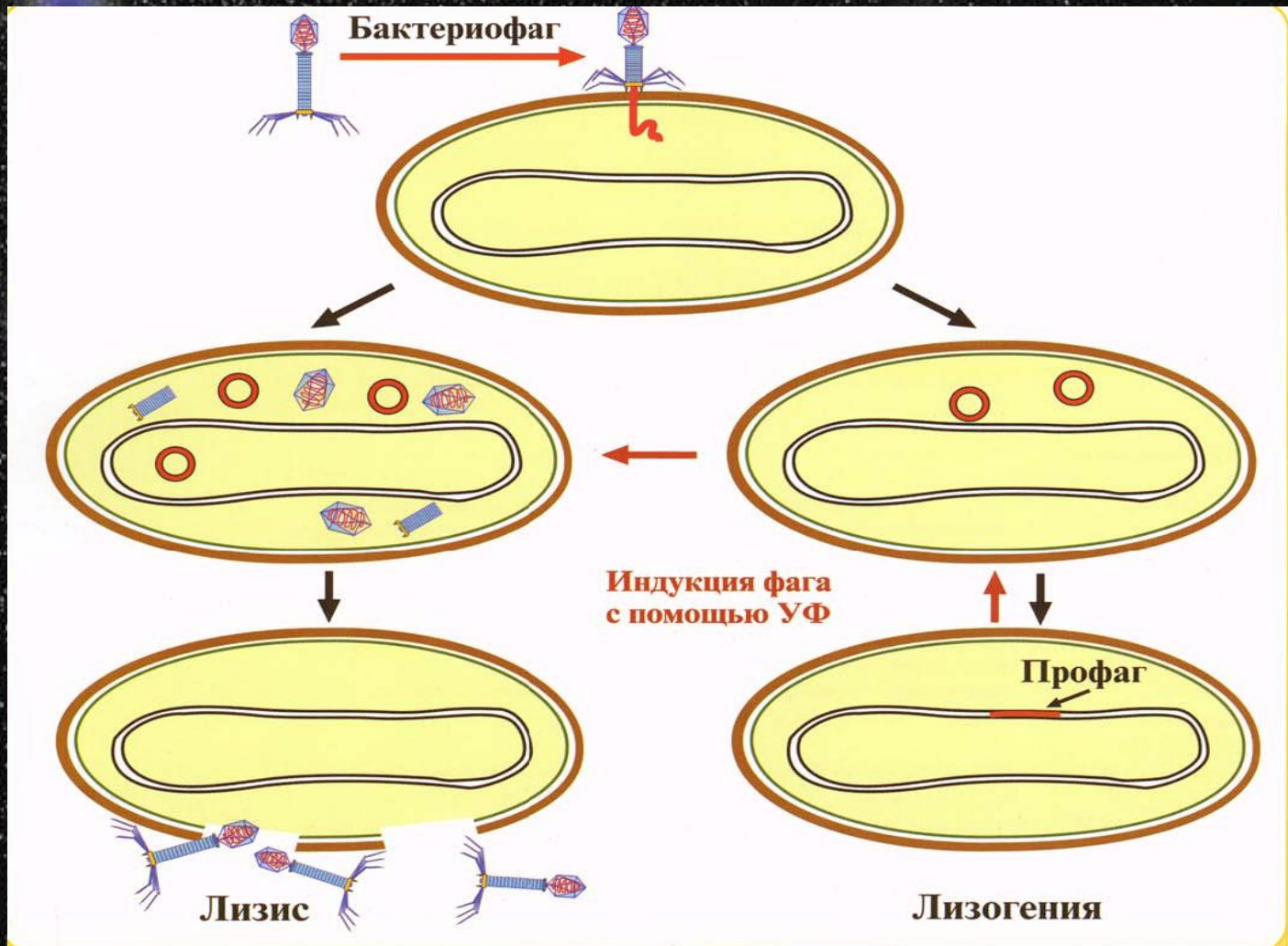


Рис. 4.19. Пути развития умеренного фага лямбда

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