

ОБЩАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

Лекция 3

Основные отличия вирусов от других форм жизни

- ⇒ **Один тип нуклеиновой кислоты**
- ⇒ **Отсутствие**
 - ✓ клеточного строения
 - ✓ белоксинтезирующих систем
 - ✓ энергозапасающих систем
- ⇒ **Возможность интеграции в клеточный геном** и синхронной с ним репликации
- ⇒ **разобщённый (дизъюнктивный) способ** размножения (репликации)

Формы существования вирусов

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

✓ НК

✓ капсид

✓ [суперкапсид]

. Н-р, вирион имеет форму...

▣ **внутриклеточная** – **вирус**:

▣ размножение,

▣ заболевания:

- Представлен **нуклеиновой кислотой**

Н-р, вирус размножается.....

Вирус гриппа....

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** (основной таксон в классификации вирусов) - название таксона заканчивается на **-virus**.
6. **Вирус**
7. **Серовары** - По антигенной структуре

Например: семейство - Orthomyxoviridae

Род - Influenzavirus

вирус гриппа

вариант H1N1(Гонконг, 1981)

КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

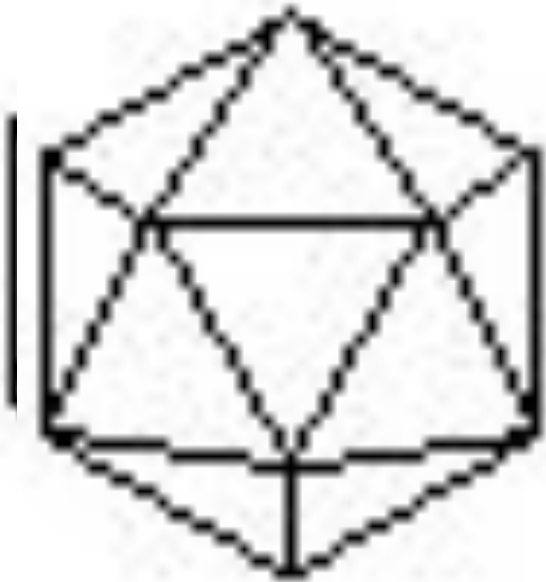
ДНК-геномные вирусы		
1цепь	2цепи	
простые	простые	сложные
Parvoviridae	Adenoviridae Papovaviridae	Poxviridae Herpesviridae Hepadnaviridae

КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

РНК- геномные вирусы (-viridae)

1цепь		2цепи		
простые	сложные		простые	
+(нить)	+(нить)	-(нить)		+/- (нить)
		целая	фрагментированная	фраг.
Picornaviridae Caliciviridae	Retroviridae Togaviridae Flaviviridae Coronaviridae	Paramyxoviridae Rhabdoviridae Filoviridae	Orthomyxoviridae Bunyaviridae Arenaviridae	Reoviridae

Принцип строения вириона



простой:

НК+ капсид = нуклеокапсид



Сложный:

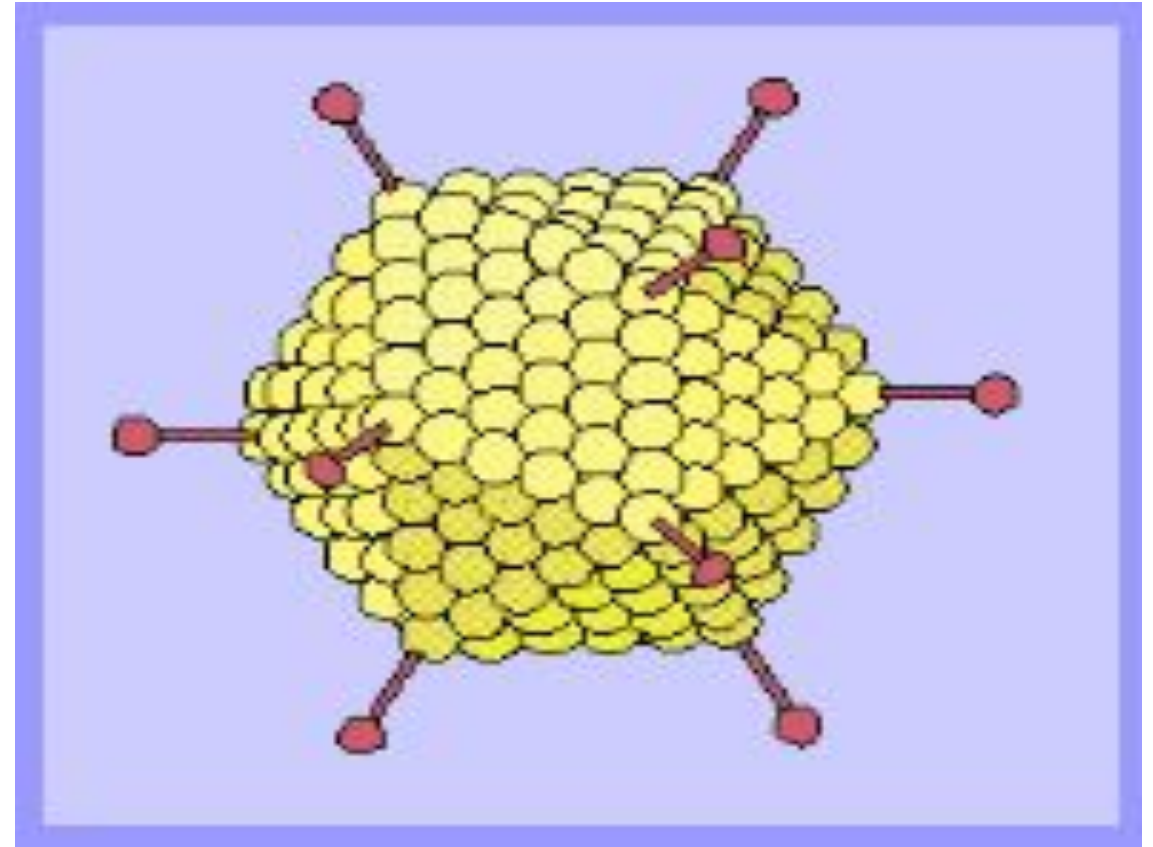
**нуклеокапсид +
суперкапсид**

Типы симметрии капсида

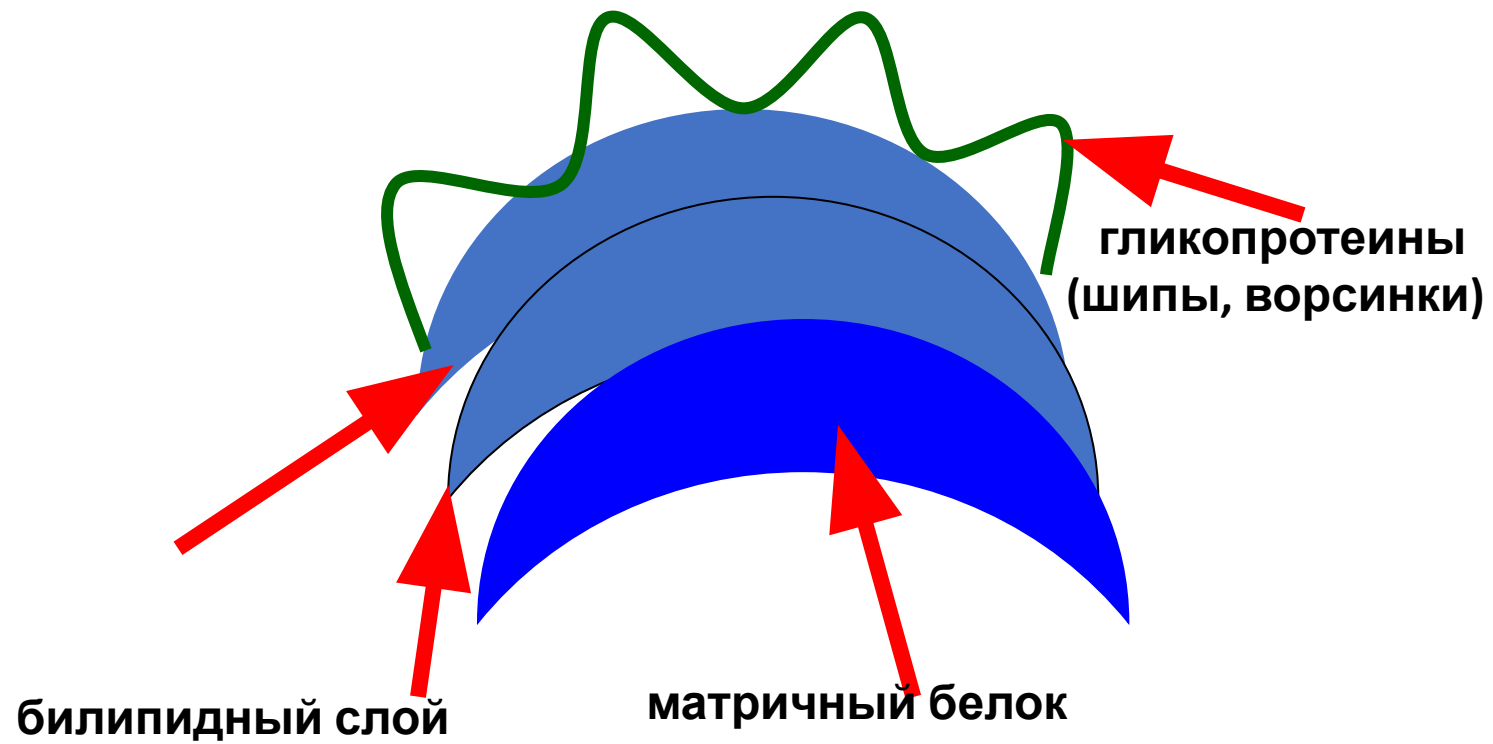
спиральная



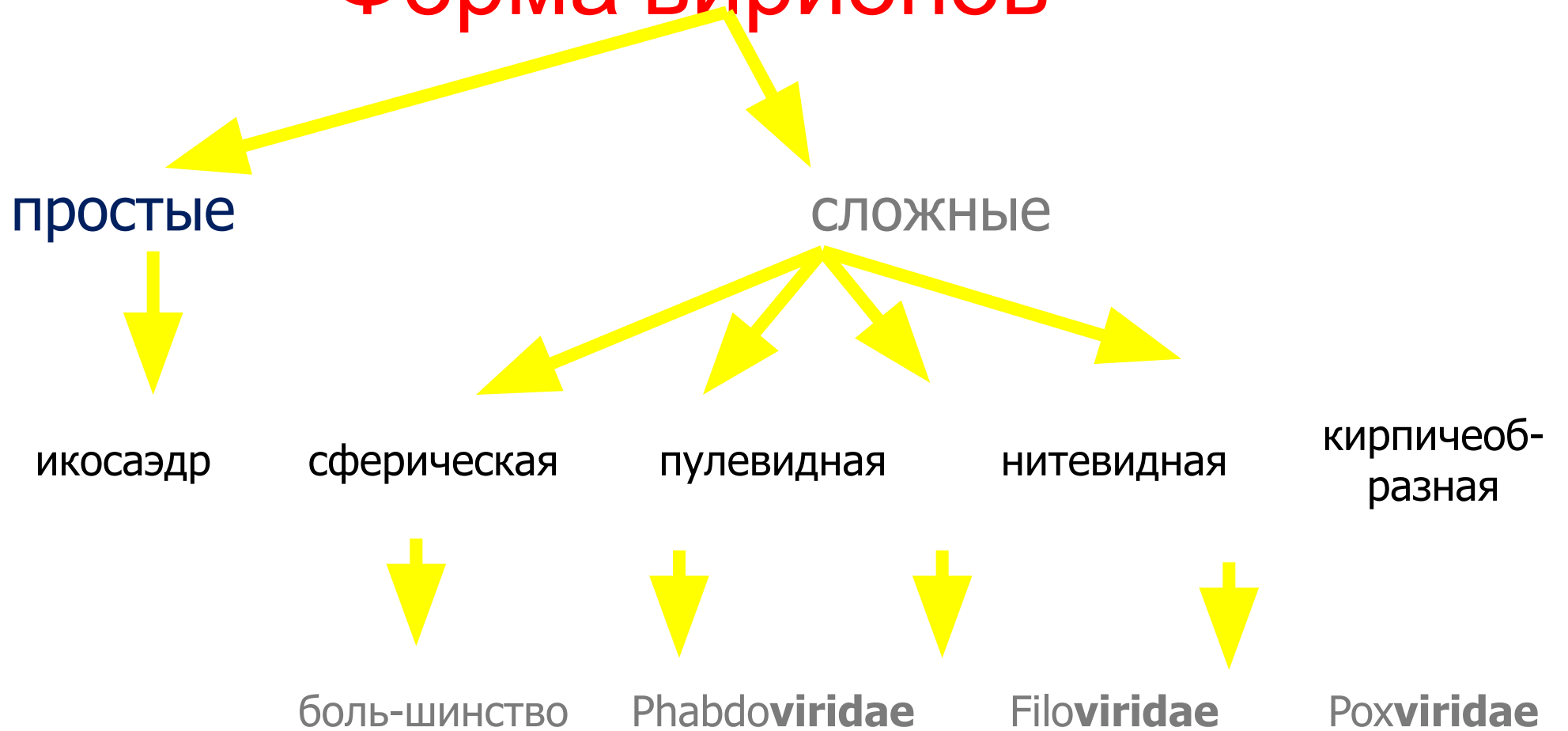
кубическая



Принцип строения суперкапсида



Форма вирионов



Общая характеристика ДНК вирионов

- форма:

- Линейная,
- Кольцевая.

- на концах – **ИДЕНТИЧНЫЕ ПОВТОРЫ**:

- **маркеры** вирусной ДНК (не клеточной),
- способны замыкать ДНК в кольцо, что необходимо при:
 - Репликации,
 - Транскрипции,
 - Интеграции в клеточный геном,
 - Придает устойчивость к клеточным эндонуклеазам.

Общая характеристика РНК вирусов

•форма:

- Линейная,
- Кольцевая.

•структура:

- Цельная,
- Фрагментированная.

•информационная функция:

- +нить (позитивный геном) = иРНК (геномная РНК выполняет функцию иРНК),
- -нить (негативный геном) \neq иРНК (не выполняет).

Общая характеристика белков вирусов

1. Структурные

- **Капсидные** – образуют капсид,
- «**Внутренние**», гистоноподобные – связаны с нуклеиновой кислотой (рибо/дезоксирибонуклеопротеин).

2. Функциональные (ферменты)

- Вирионные,
- Вирусиндуцированные,
- Вирус может модифицировать клеточные ферменты.

Схема строения простоустроенного вириона = паповавируса (вирус имеет двунитевую кольцевую ДНК)



Схема строения вируса гепатита А (вирус имеет однонитевую +РНК)

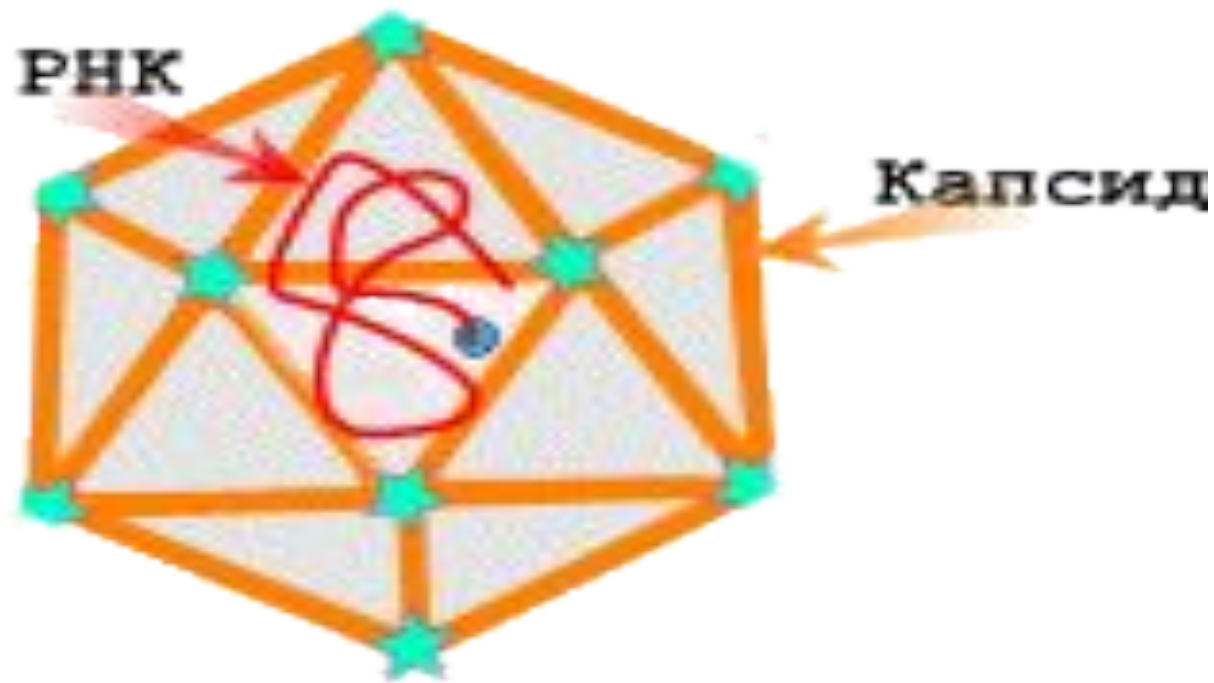
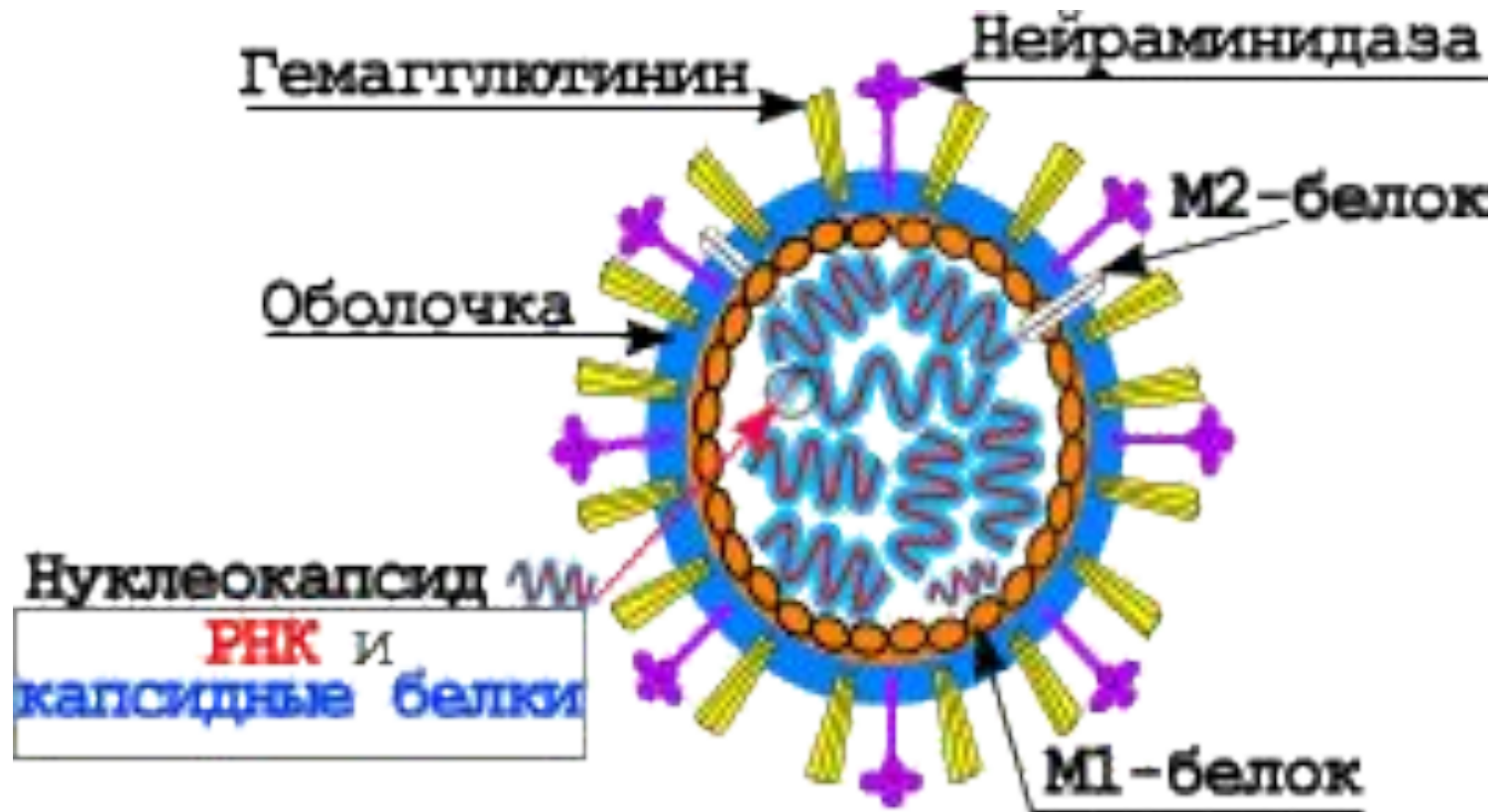


Схема строения сложноустроенного вириона= вируса герпеса (вирус с линейной двухнитевой ДНК)



Схема строения вируса гриппа = вирус с однонитевой фрагментированной (8 фрагментов) минус РНК



Свойство вирусов = строгий

цитотропизм

- = Избирательность поражения вирусами определенных клеток,
- = способность вирусов к репликации только в строго определённых клетках и органах,
- т.к. поражаемая клетка должна иметь соответствующие данному вирусу:
 - рецепторы для адсорбции,
 - ферменты депротеинизации.

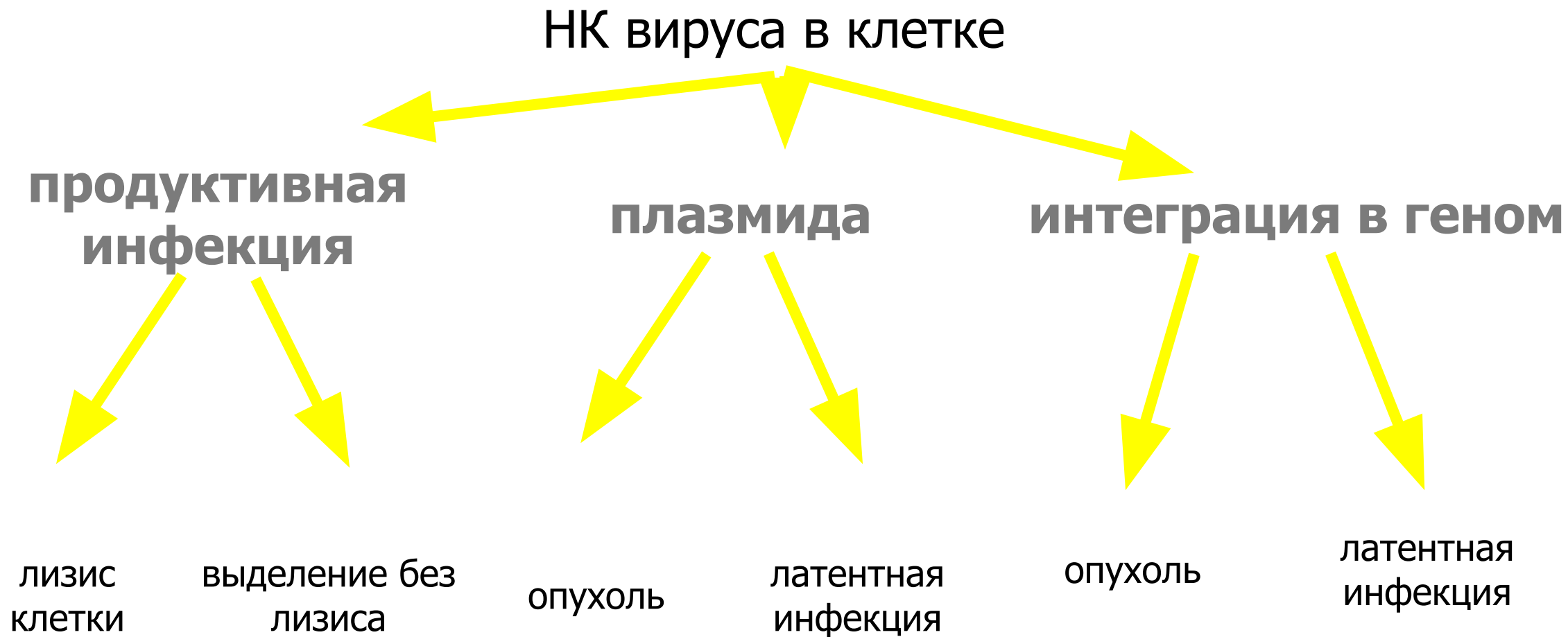
Например,

- Гепатотропные вирусы - клетки печени,
- Нейротропные - нервные клетки.

Патологические процессы, вызываемые вирусами

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

Исходы вирусной инфекции клетки



Репродукция вирусов

Различают **три типа взаимодействия вируса с клеткой:**

- **1. продуктивный тип**, при котором образуются новые вирионы,
- **2. abortивный тип**, характеризующийся прерыванием инфекционного процесса в клетке, поэтому новые вирионы не образуются;
- **3. интегративный тип = вирогения**, заключающийся в интеграции, т.е. встраивании вирусной ДНК в виде **провируса** в хромосому

Продуктивный тип взаимодействия вируса с клеткой

Этапы размножения вирусов в чувствительной клетке:

1. адсорбция вирионов на клетке = прикрепление,
2. проникновение и депротеинизация,
3. синтез компонентов вируса:
 - ранних и поздних белков,
 - множественная репликация генома,
4. сборка вирионов,
5. выход вирионов из клетки.

1. Адсорбция вирионов на клетке = прикрепление вириона к поверхности клетки:

• 2 фазы:

- **неспецифическая** – ионное притяжение между вирусом и клеткой,
- **специфическая** – обусловлена комплементарностью рецепторов чувствительных клеток и вирусов:

Рецепторы вирионов = белки на поверхности вирусов - наз-ся **прикрепительными**, чаще всего это *гликопротеины*.

- У просто устроенных вирионов они располагаются в капсиде,
- у сложноустроенных – в суперкапсиде.

Рецепторы клеток:

- белки,
- липиды,
- гликопротеины,
- гликолипиды и др.

Н-р, **сиаловая кислота** в составе гликопротеидов и гликолипидов клеток дыхательных путей – рецептор для вируса гриппа,

- **ацетилхолиновые рецепторы** нервных клеток – для вируса бешенства.

2. Проникновение вируса в клетку

3 пути:

- Рецептор-зависимый эндоцитоз,
- Слияние оболочки вириона с клеточной мембраной,
- Смешанный.

2.1. Проникновение вируса в клетку:

Рецептор-зависимый эндоцитоз

=захватывание и поглощение вириона клеткой:

1. Клеточная мембрана с вирионом впячивается и образуется внутриклеточная вакуоль (эндосома),
2. Содержимое эндосомы закисляется за счет АТФ-зависимого протонного насоса,
3. Слияние липопротеиновой оболочки сложно- устроенных вирусов с мембраной эндосомы (у простоустроенных процесс не изучен),
4. Выход вирусного нуклеокапсида в цитозоль клетки,
5. Эндосомы объединяются с лизосомами, которые разрушают оставшиеся вирусные компоненты.

2.2. Проникновение вируса в клетку - слияние оболочки вириона с клеточной мембраной = **виropексис**: — характерно для оболочечных вирусов, имеющих **белки слияния** (парамиксовирусы, герпесвирусы, ретровирусы)

происходит:

- точечное взаимодействие вирусного **белка слияния** с липидами клеточной мембраны,
- интеграция липопротеиновой оболочки вируса с клеточной мембраной,
- выход нуклеокапсида в цитозоль.

2а. Депротенинизация вирусов= «раздевание»

= освобождение нуклеиновой кислоты путём сброса вирусом белковой (-ых) оболочки (-чек)

1. При виропексисе – в эндоцитозном пузырьке (у сложных – может завершаться при проникновении в ядро клетки),
2. При слиянии мембран – одновременно с проникновением.

- **начинается** сразу после прикрепления к рецепторам и проникновения в клетку,
- **продолжается** в процессе транспорта,
- **завершается** в специализированных участках:
 - для пикорнавирусов – в **цитоплазме** с участием лизосом и аппарата Гольджи,
 - для герпесвирусов – **околоядерное пространство** или поры ядерной мембраны,
 - для аденовирусов – сначала структуры цитоплазмы, затем **ядро**.
- **Конечными продуктами** раздевания являются:
 - **нуклеиновая кислота** - пикорнавирусы,
 - **нуклеокапсид** – оболочечные РНК-содержащие,
 - **сердцевина вириона**.

3. Синтез вирусных компонентов = дизъюнктивная репродукция

= синтез вирусных белков и нуклеиновых кислот,

= происходит в разных частях клетки и в разное время,

= 2 параллельных процесса:

- 1. Синтез вирусных белков,**

- 2. Репликация вирусных геномов.**

1. Синтез вирусных белков

- В зараженной клетке вирусный геном кодирует синтез **2-х групп белков:**

Структурные = входят в состав вириона (геномные, капсидные и суперкапсидные).

Неструктурные = обслуживают внутриклеточную репродукцию вируса на разных этапах:

- А) **ферменты синтеза РНК или ДНК** (РНК- ДНК-полимеразы) обеспечивают транскрипцию и репликацию вирусного генома,
- Б) **белки-регуляторы,**
- В) **предшественники вирусных белков** – нестабильные, быстро нарезаются на структурные,
- Г) **ферменты, модифицирующие вирусные белки** (протеиназы, протеинкиназы).

- **2 процесса составляют синтез белков:**

Транскрипция – переписывание генетической информации с нуклеиновой кислоты вируса в нуклеотидную последовательность иРНК,

Трансляция – считывание иРНК на рибосомах с образованием белков.

3.1.а. Синтез вирусных белков – варианты:

ДНК-содержащие вирусы:

Геномная ДНК вируса



транскрипция иРНК



трансляция белка вируса.

- Ферменты:

- клеточная полимераза – если вирусы транскрибируются в ядре клетки (аденовирусы, паповавирусы, герпесвирусы)
- собственная РНК-полимераза – если вирус транскрибируется в цитоплазме (поксвирусы).

3.1.б. Синтез вирусных белков - варианты:

Плюс-нитевые РНК-содержащие вирусы

= вирусный геном выполняет функцию иРНК (пикорнавирусы, флавивирусы, тогавирусы):

геномная РНК вируса



трансляция белка вируса

3.1.в. Синтез вирусных белков -

варианты:

Минус-нитевые РНК-содержащие вирусы
(ортомиксовирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы) **и двунитевые**
(реовирусы):

Геномная РНК вируса



→ транскрипция иРНК

(РНК-полимераза, связанная с нуклеиновой кислотой вируса)



→ трансляция белка вируса

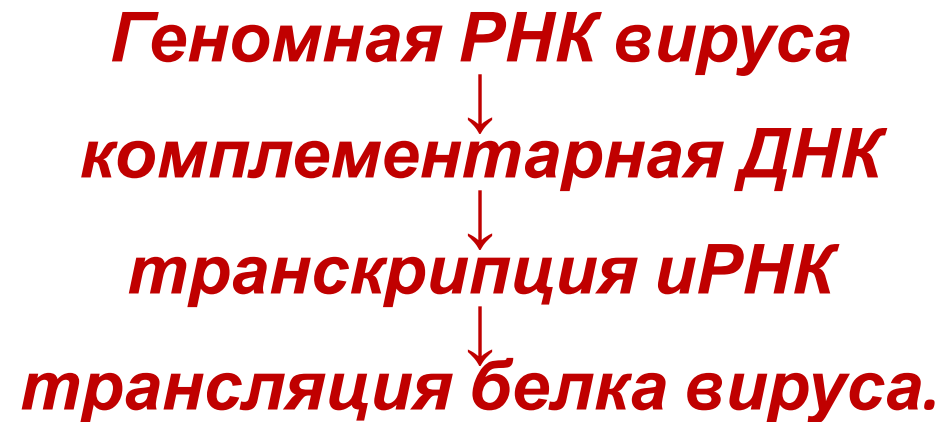
3.1.г. Синтез вирусных белков - варианты:

Ретровирусы:

- геном состоит из 2-х одинаковых молекул РНК = диплоидный,
- имеют фермент **обратную транскриптазу или ревертазу**

- происходит **обратная транскрипция:**

= на матрице **геномной РНК** транскрибируется **комплементарная ДНК** → копируется в **двунитевую ДНК** → интегрируется в клеточный геном и в его составе транскрибируется в **иРНК** (клеточная ДНК-зависимая РНК-полимераза):



3.2. Репликация вирусных геномов

- зависит от типа нуклеиновой кислоты,
- наличия вирусоспецифических или клеточных полимераз,
- от способности вирусов индуцировать образование полимераз в клетке.

3.2.a. Репликация вирусных геномов - варианты:

Двунитевые ДНК-вирусы (аденовирусы, герпесвирусы, поксвирусы)

= **полуконсервативный механизм:**

- происходит в ядре (исключение – поксвирусы):
- нити расплетаются,
- каждая комплементарно достраивает 2-ю нить,

3.2.6. Репликация вирусных геномов

Однонитевые ДНК-вирусы

(парвовирусы)

- используют **клеточные ДНК-полимеразы**:
- на исходной вирусной ДНК (+нить) синтезируется **минус-нить**,
- **минус нить** = матрица для синтеза **плюс-нити ДНК** нового вириона,
- на исходной вирусной ДНК (+нить) синтезируется **иРНК** → трансляция вирусных пептидов.

•

3.2.в.Репликация вирусных геномов

Плюс-однонитевые РНК-вирусы

(пикорнавирусы, флавивирусы, тогавирусы, полиовирусы)

- = геномная нить РНК выполняет функцию иРНК:
- РНК вируса → **рибосомы** → полипептид → расщепляется фрагменты:
 - РНК-зависимая РНК-полимераза,
 - вирусные протеазы,
 - капсидные белки.
- Полимераза на основе **+нити** синтезирует **-нить** → **временная двойная РНК** = промежуточное репликативное звено (содержит много **-нитей**) = шаблоны для синтеза **+нитей РНК** и белков.

3.2.г.Репликация вирусных геномов

Минус-однонитевые РНК-вирусы

(Рабдовирусы, парамиксовирусы, ортомиксовирусы)

– имеют РНК-зависимую РНК-полимеразу:

Минус-нитевая РНК + РНК-полимераза → неполные и полные **плюс-нити РНК**:

- неполные → **иРНК** для синтеза вирусных белков,
- полные → **матрица** для синтеза минус РНК.

3.2.д. Репликация вирусных геномов

Двунитевые РНК-вирусы

(реовирусы, ротавирусы)

– как у минус нитевых, но в цитоплазме клеток.

- Отличие:
- **плюс нити** функционируют и как **иРНК** и являются **матрицами** для синтеза **минус-нитей РНК**,
- минус РНК + плюс РНК → двунитевая РНК вирионов.

3.2.e. Репликация вирусных геномов

Ретровирусы

= плюс-нитевые диплоидные РНК-содержащие вирусы, имеют обратную транскриптазу:

- обратная транскриптаза на матрице РНК-вируса синтезирует **минус-нить ДНК**,
- с **минус-нити ДНК** копируется **плюс-нить ДНК** → **двойная нить ДНК**, замкнутая в кольцо.
- **кольцевая ДНК** встраивается в геном клетки → **провирус**,
- вирионные РНК образуются при транскрипции одной из нитей **провируса** при участии клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы.

4. Формирование вирусов

Происходит путем **самосборки** = составные части вируса транспортируются в определенный участок цитоплазмы или ядра и объединяются:

- процесс многоступенчатый с образованием промежуточных продуктов,
- **сборка просто-устроенных вирусов** = образование нуклеокапсидов: нуклеиновая кислота + капсидные белки,
- **сборка сложно-устроенных вирусов:**
 - = сначала формируется нуклеокапсид, который взаимодействует с мембранами клетки:
 - = вирусы, реплицирующиеся в ядре - с участием мембраны ядра,
 - = вирусы, реплицирующиеся в цитоплазме – мембран ЭПС;
 - = у миксовирусов в сборку вовлекается **М-белок** = посредник между нуклеокапсидом и липопротеиновой оболочкой,
 - = в состав оболочки включаются компоненты клетки хозяина: липиды и углеводы.

5. Выход вирусов из клетки

1. взрывной путь: клетка погибает и вирусы выходят наружу =

- простоустроенные 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.

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 вирус-помощнике.

(Н-р, вирус гепатита Д – дефектный, вирус гепатита В - помощник).

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

• 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.

Интегративный тип взаимодействия вируса с клеткой = вирогения

= нуклеиновая кислота вируса встраивается в хромосому клетки хозяина,
= встроенный в хромосому клетки вирус = **провирус**
= наблюдается у онкогенных вирусов, инфекционных ДНК- и РНК-содержащих:

- **ДНК-содержащие вирусы:**

- вирусная ДНК в кольцевой форме прикрепляется к клеточной ДНК в месте гомологии нуклеотидных последовательностей,
- и встраивается в определенный локус хромосомы при участии ферментов:
 - рестриктазы,
 - эндонуклеазы,
 - лигазы.

- **РНК-содержащие вирусы:**

- синтез комплементарной нити ДНК на матрице РНК (фермент **обратная транскриптаза**),
- образование двунитевой ДНК и замыкание ее в кольцо,
- встраивание кольцевой ДНК в хромосому клетки.

Значение вирогении

- 1. Сохранение вирусной информации в составе клеточного генома = **персистенция**:
- → клетка при этом получает новые свойства:
 - А) без видимого изменения,
 - Б) расстройство регуляции синтеза белка,
 - В) неконтролируемое деление клетки.
- 2. **эволюция вирусов**: при выщеплении из генома клетки вирус может захватить отдельные гены.

Исходы активации персистирующего вируса

1. рецидив того же заболевания,
2. **развитие другого заболевания**, вызываемого тем же самым вирусом,
Н-Р, - корь,
- панэнцефалит
3. **развитие другого заболевания**, вызванного вирусом, который активизировался в организме хозяина под влиянием персистирующего вируса,
Н-Р, онкогенные вирусы.

Способы культивирования вирусов

- **3 модели:**

- куриный эмбрион
- культура клеток
- организм лабораторного животного



обнаружение наличия вируса
(индикация)



определение типа вируса
(идентификация)

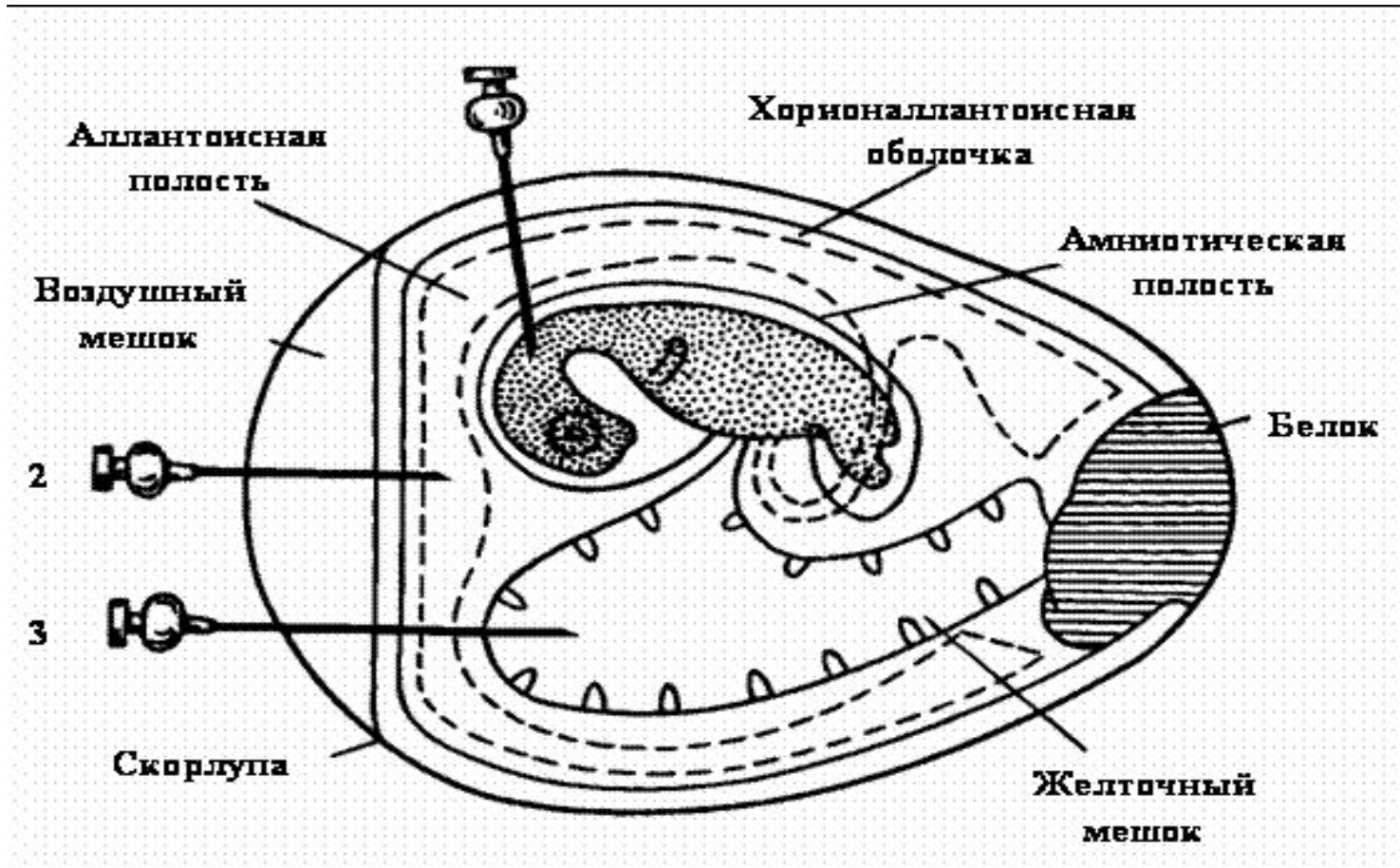
Использование для вирусологического метода куриного эмбриона



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.

Культивирование в курином эмбрионе



Заражение в аллантоисную полость

Заражение в амнион



Заражение в желточный мешок



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:**

▣ а) по числу жизнеспособных поколений на:

- первичные,
- перевиваемые,
- полуперевиваемые;

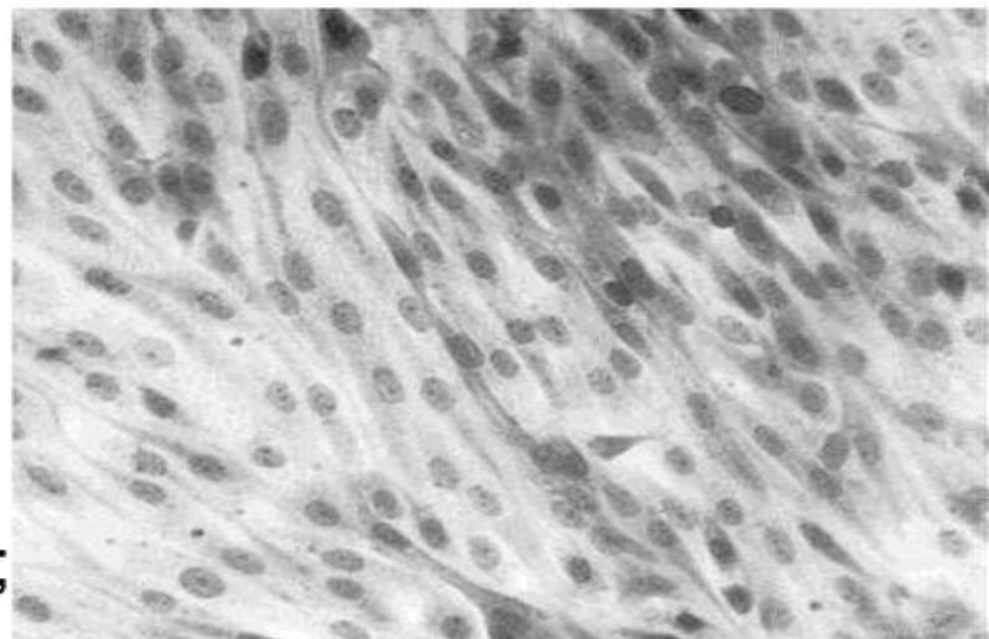
б) **по происхождению:**

- эмбриональные,
- опухолевые,
- из взрослых организмов.

Классификация клеточных культур

В зависимости от техники приготовления:

- **однослойные** – клетки, способные прикрепляться и размножаться на поверхности лабораторной посуды в виде монослоя;
- **суспензионные** – клетки размножаются во всем объеме питательной среды при постоянном ее перемешивании;
- **органные** – цельные кусочки органов и тканей, сохраняющие исходную структуру вне организма.

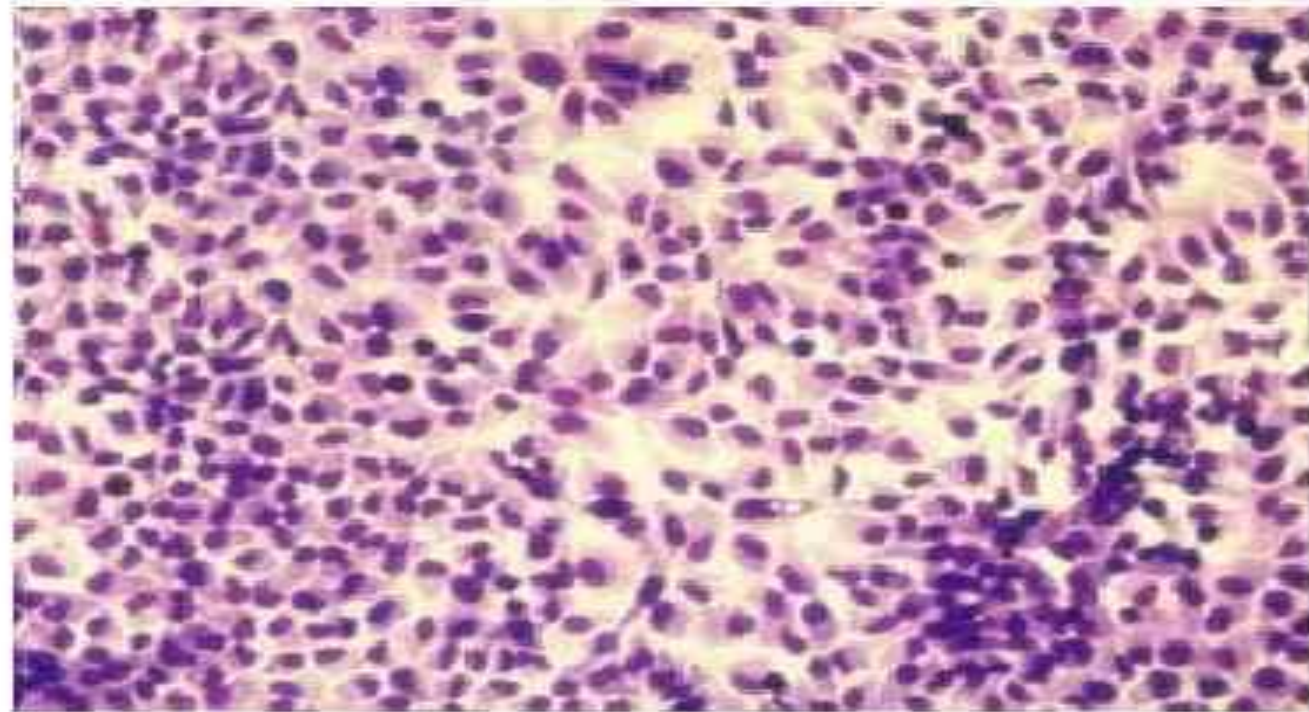


Первичные (эмбриональные) культуры клеток

- 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,
 - ФЭК – фибробласты эмбриона курицы,
 - ФЭЧ – фибробласты эмбриона человека.

Первичные клеточные культуры

- Получают методом трипсинизации тканей (как правило, эмбриональных), выдерживают не более 5-10 пассажей после выделения из тканей



Пример: фибробласты эмбриона человека (ФЭЧ)

Перевиваемые культуры клеток

▣ **Перевиваемые** = стабильные = готовят из опухолевых клеток, способных длительно расти и размножаться in vitro не меняя своих свойств.

Н-р,

- ▣ HeLa – выделены из карциномы шейки матки,
- ▣ Hep-2 – из карциномы гортани,
- ▣ Hep-3 – лимфокарцинома,
- ▣ KB – эпидермоидная карцинома полости рта,
- ▣ Детройт-6 – костный мозг больного раком легкого,
- ▣ Vero - почки зеленой мартышки.

Культуры клеток

Первично-трипсинизированные

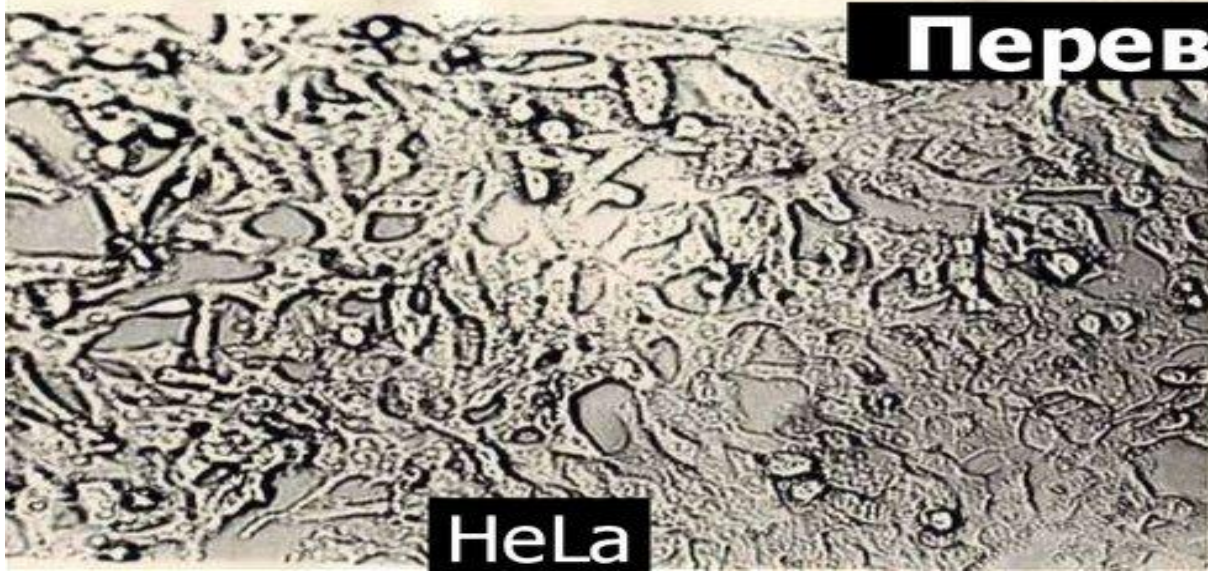


ФЭК

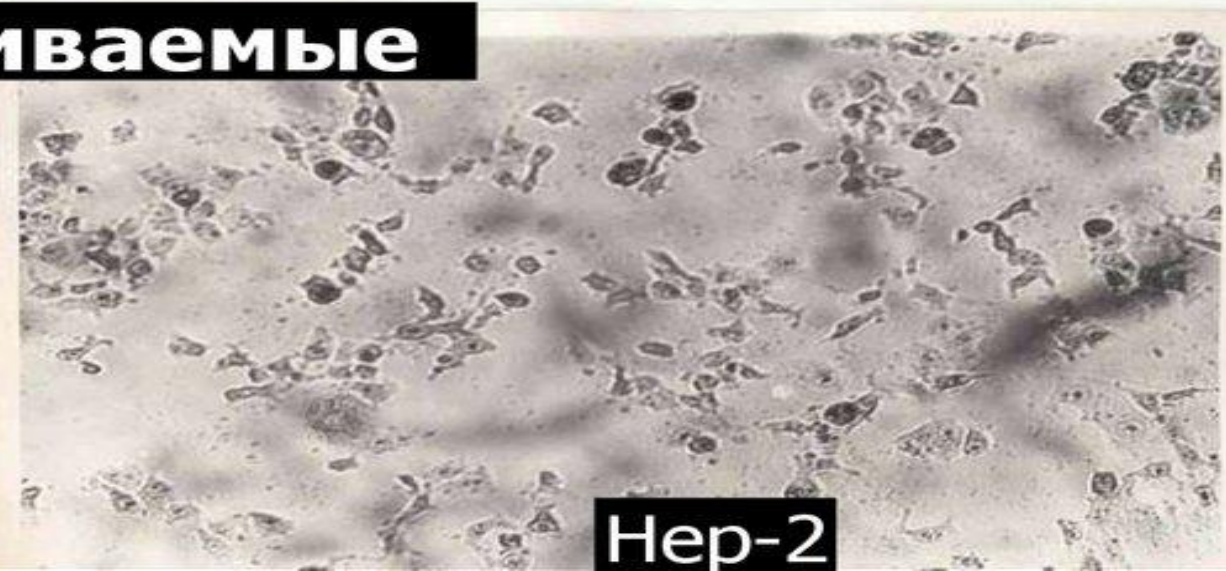


ФЭЧ

Перевиваемые



HeLa



Hep-2

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.**

Культивирование клеток



Условия культивирования клеток:

- Использование лабораторной **посуды из нейтрального стекла** – пробирки, флаконы, матрасы (=флакон 4-х гранной формы),
- Питательные среды сложного **состава** (среда 199, Игла), сод-т:
 - источники энергии (глюкозу),
 - минеральные вещества,
 - аминокислоты,
 - витамины,
 - сыворотку крови,
 - факторы роста,
- Добавление **антибиотиков** к питательной среде для подавления роста бактерий,
- Клетки чувствительны к изменениям **pH** – для контроля pH добавляют индикатор и буферные растворы,
- Соблюдение правил **асептики**,
- Соблюдение **оптимальной температуры** культивирования (36-38,5°).

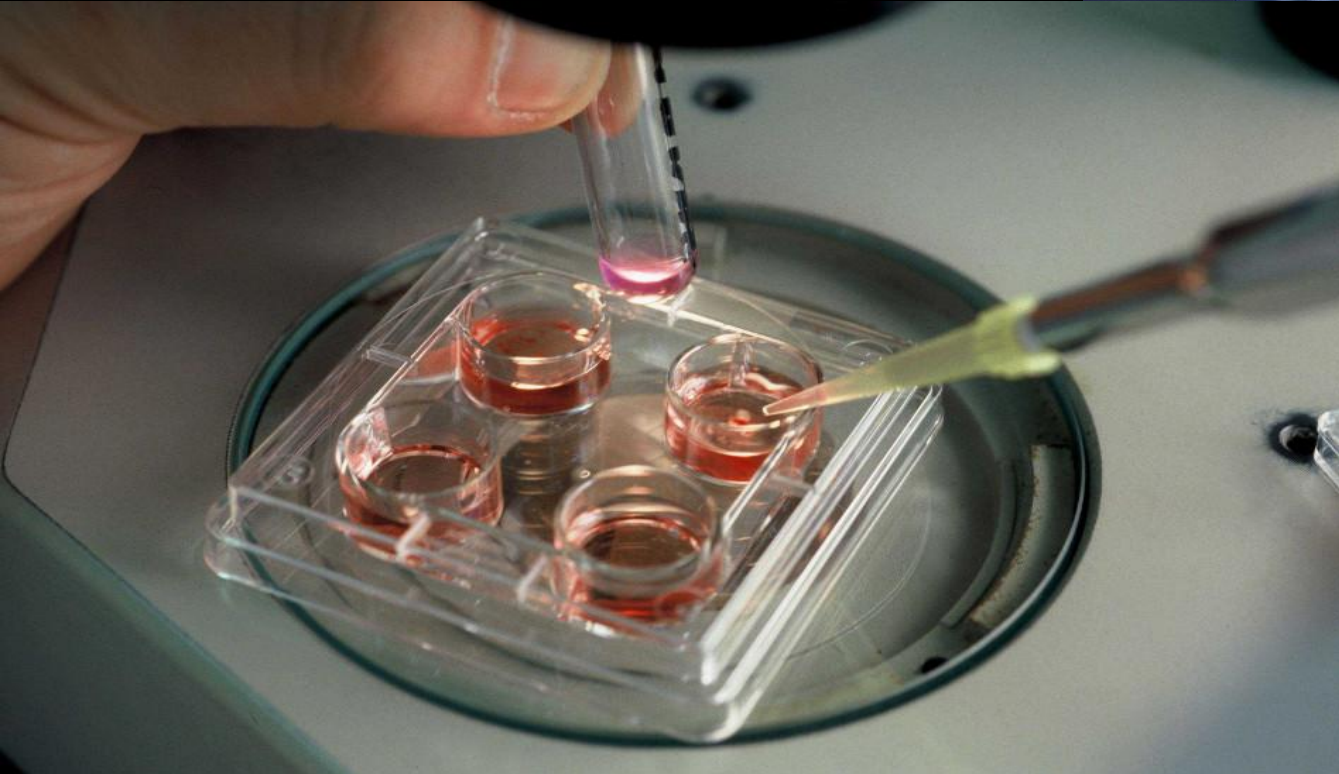
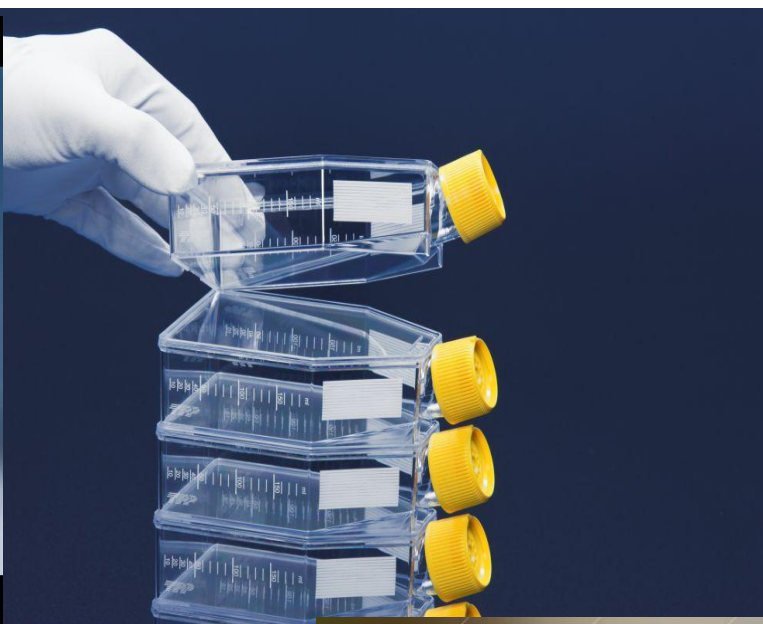
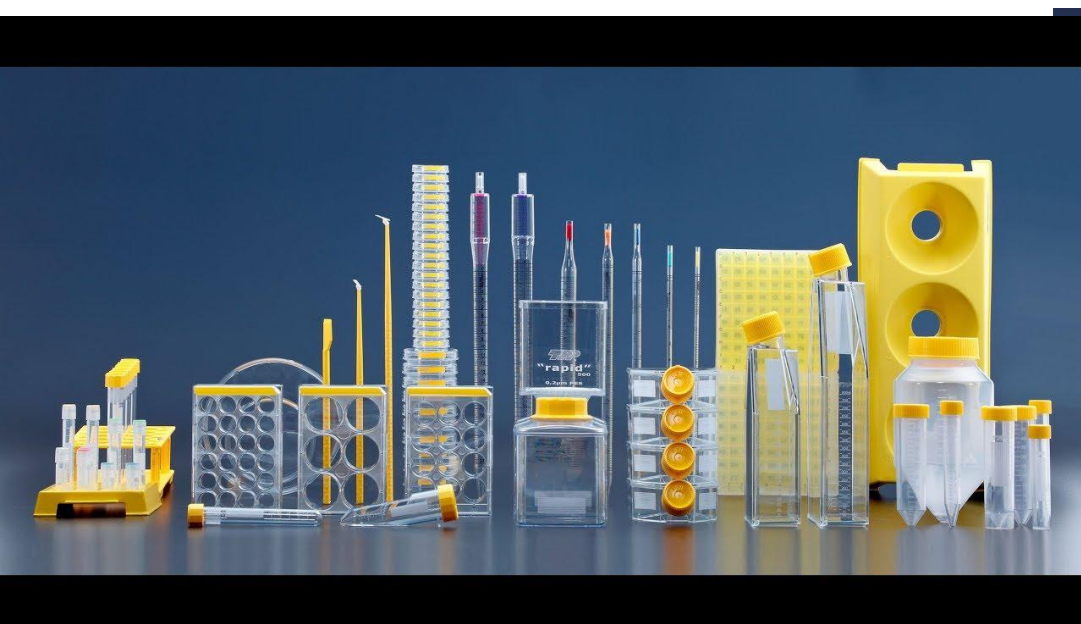
Работа с культурами клеток в стерильной комнате

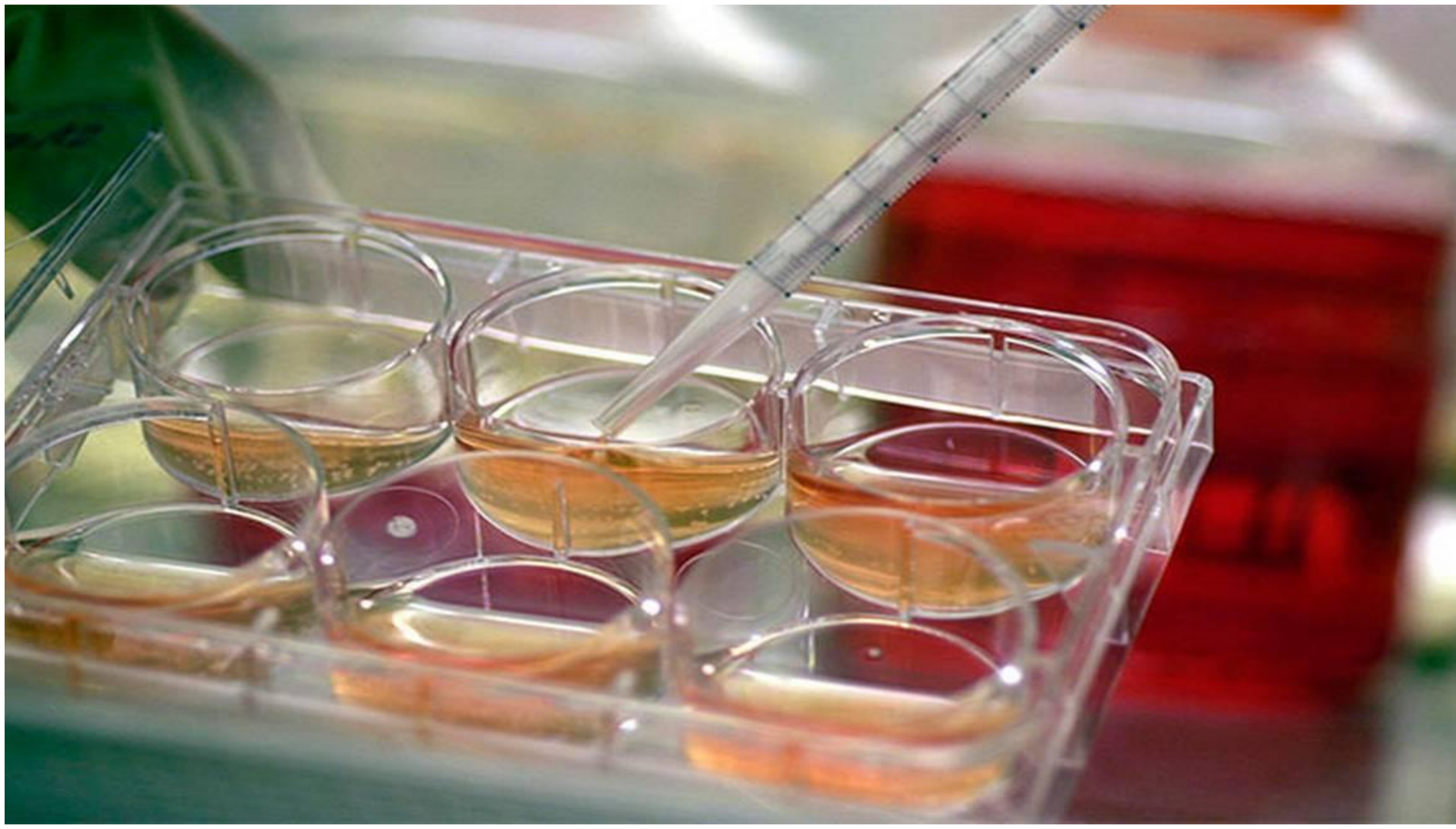


Роллеры и матрасы (многоразового и одноразового использования) для культивирования вирусов в монослое культур клеток

34







Питательные среды для культур клеток

включают большой набор различных факторов роста:

- **среда 199** (66 компонентов)
- **среда Игла** (28 компонентов)
- **раствор Хенкса**



Кроме факторов роста в среды добавляют **индикатор** (**феноловый красный**), который помогает контролировать жизнеспособность клеток:

живые клетки выделяют кислые продукты метаболизма, поэтому среда закисляется и приобретает **жёлтый цвет**. Это значит, что среду нужно поменять.

Если клетки гибнут, цвет среды остаётся **красным**.

Обнаружение = индикация вирусов в культуре клеток

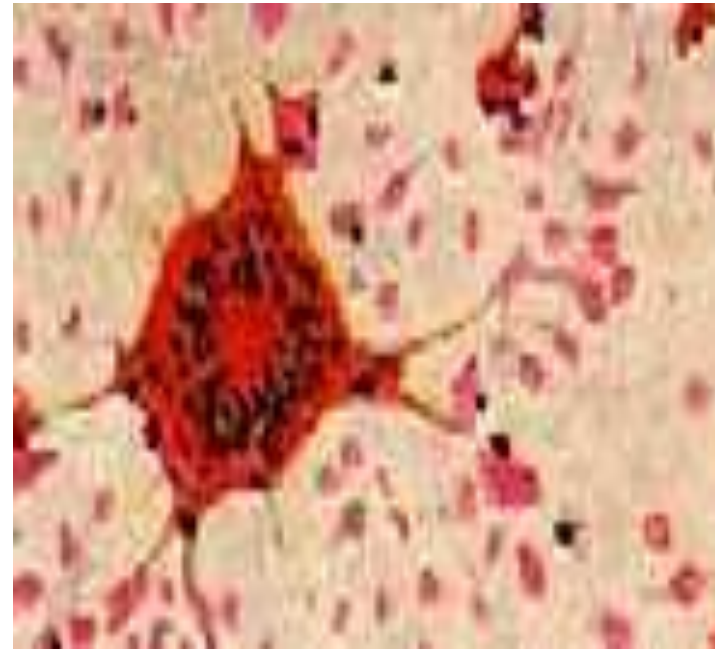
- проводят на основе следующих феноменов:
 - **цитопатогенного действия (ЦПД)** вирусов или цитопатического эффекта (ЦПЭ),
 - образования внутриклеточных включений,
 - образования “бляшек”,
 - реакции гемагглютинации, гемадсорбции или “цветной” реакции.

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

Культура клеток



ЦПД вируса

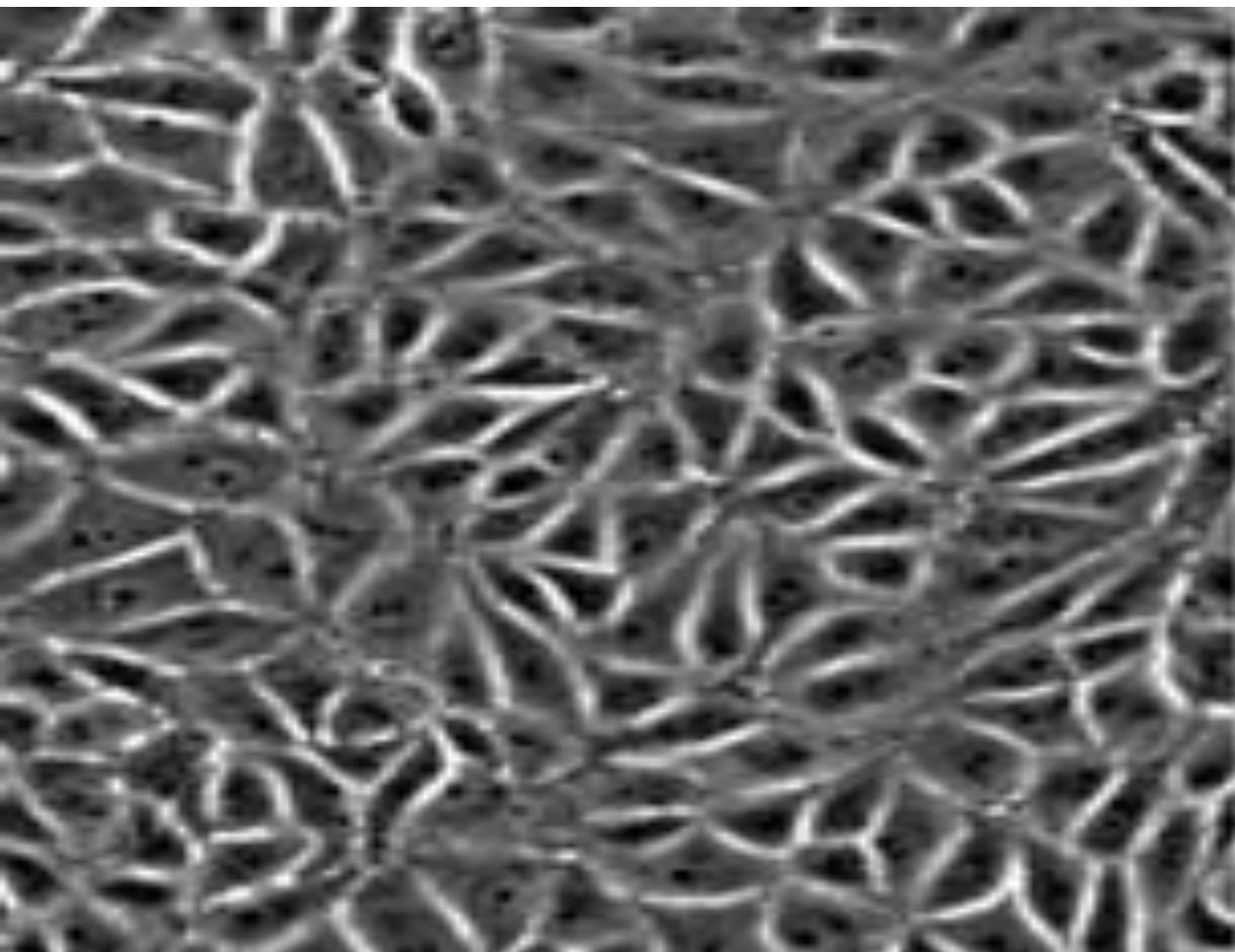


Виды ЦПД

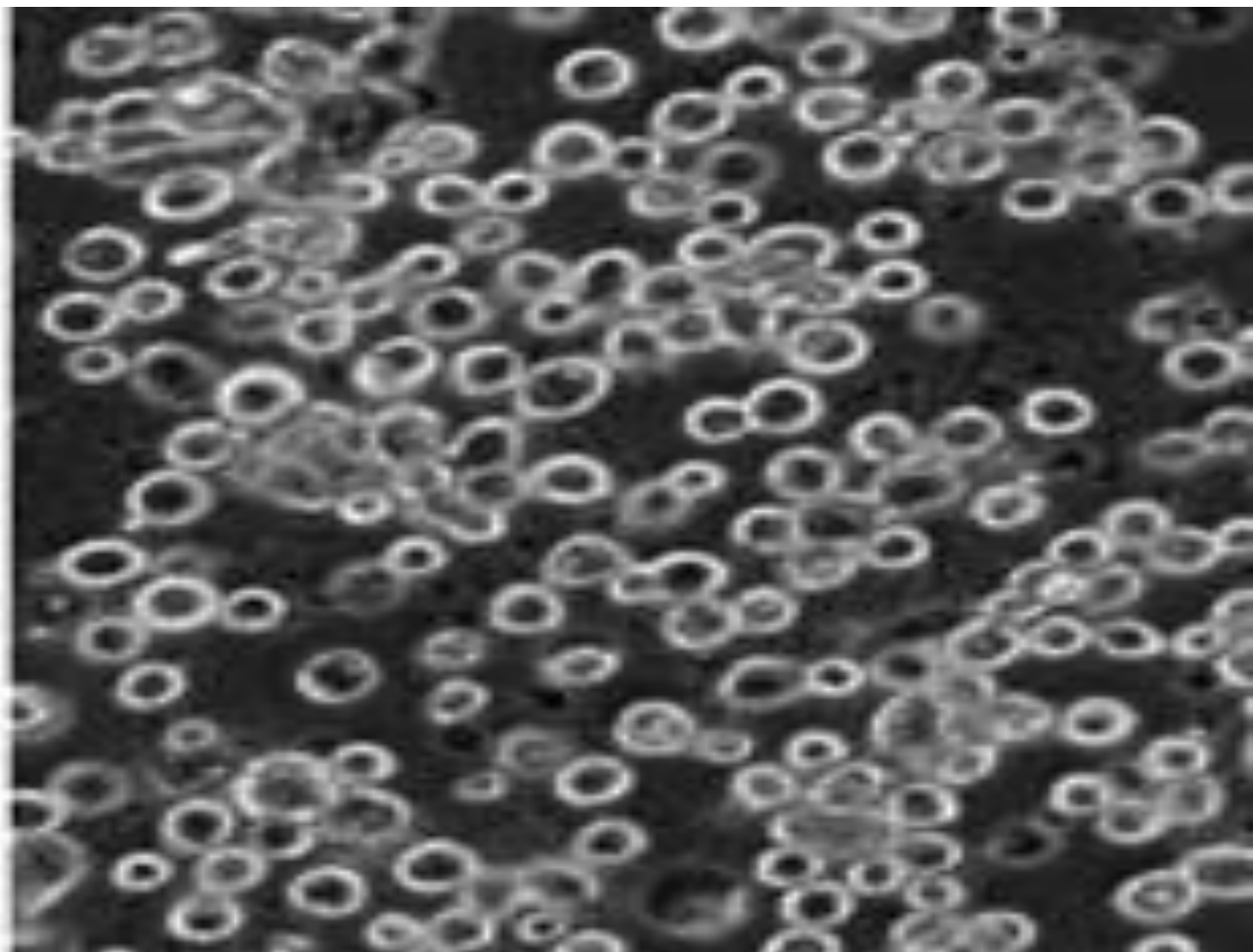
- округление и сморщивание клеток – пикорнавирусы,
- нарастающая деструкция – герпесвирусы,
- пролиферация (образование дырок) – поксвирусы,
- образование гигантских многоядерных клеток = симпласты – парамиксовирусы.

ЦПД вируса полиомиелита

Культура клеток до заражения

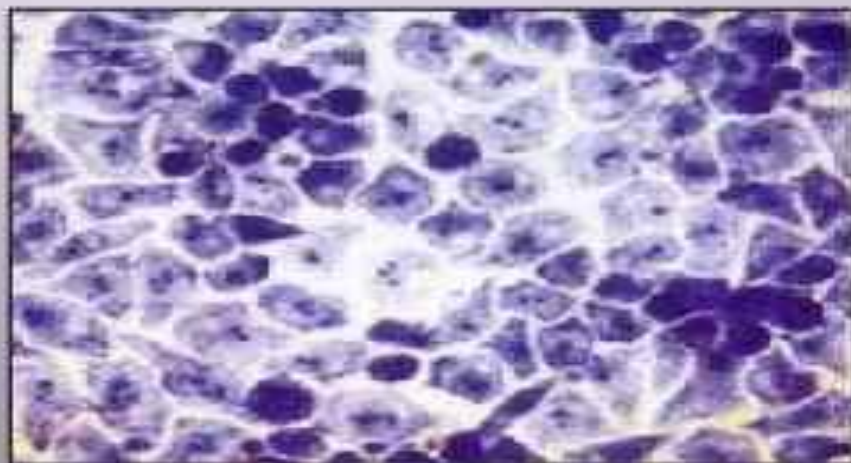


ЦПД



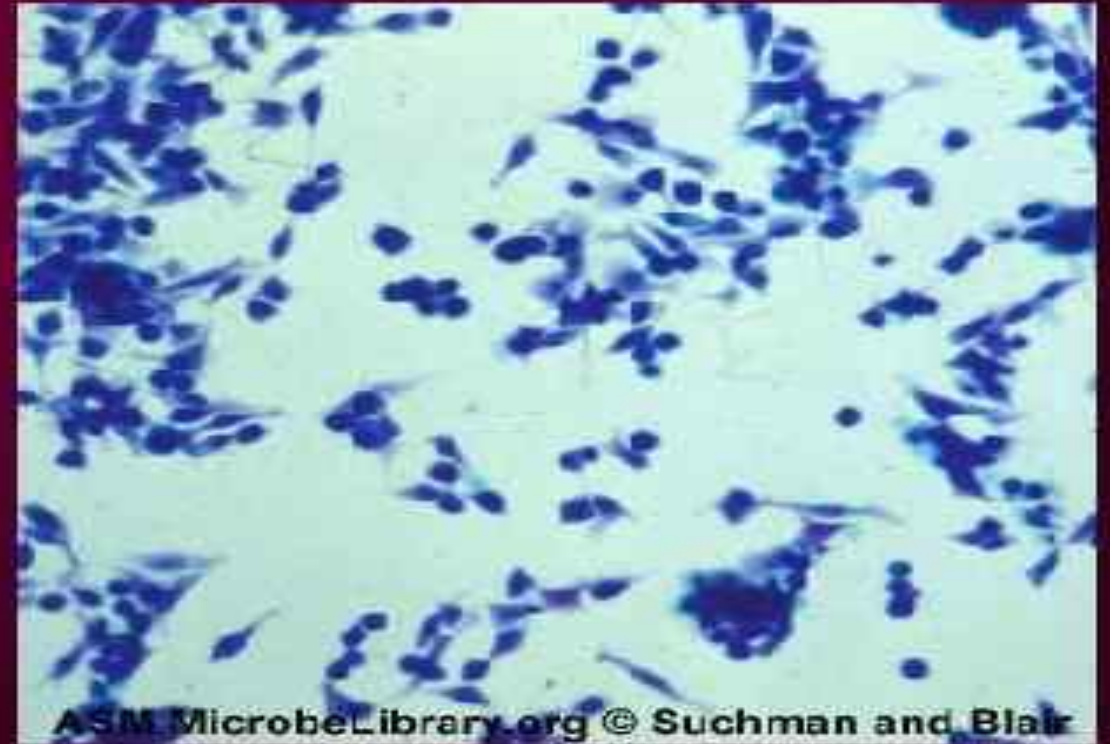
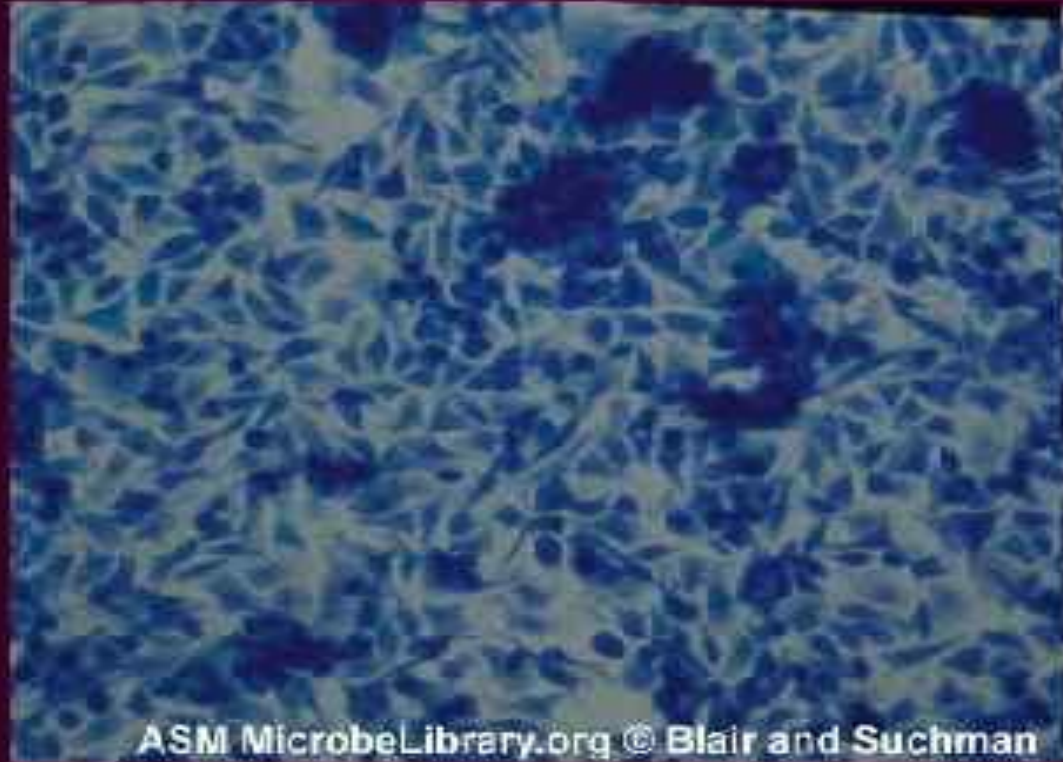
ЦПД в культуре клеток Нер-2

ДО ЗАРАЖЕНИЯ
ВИРУСОМ



НА 3-И СУТКИ ПОСЛЕ
ЗАРАЖЕНИЯ





Интakтная культура клеток

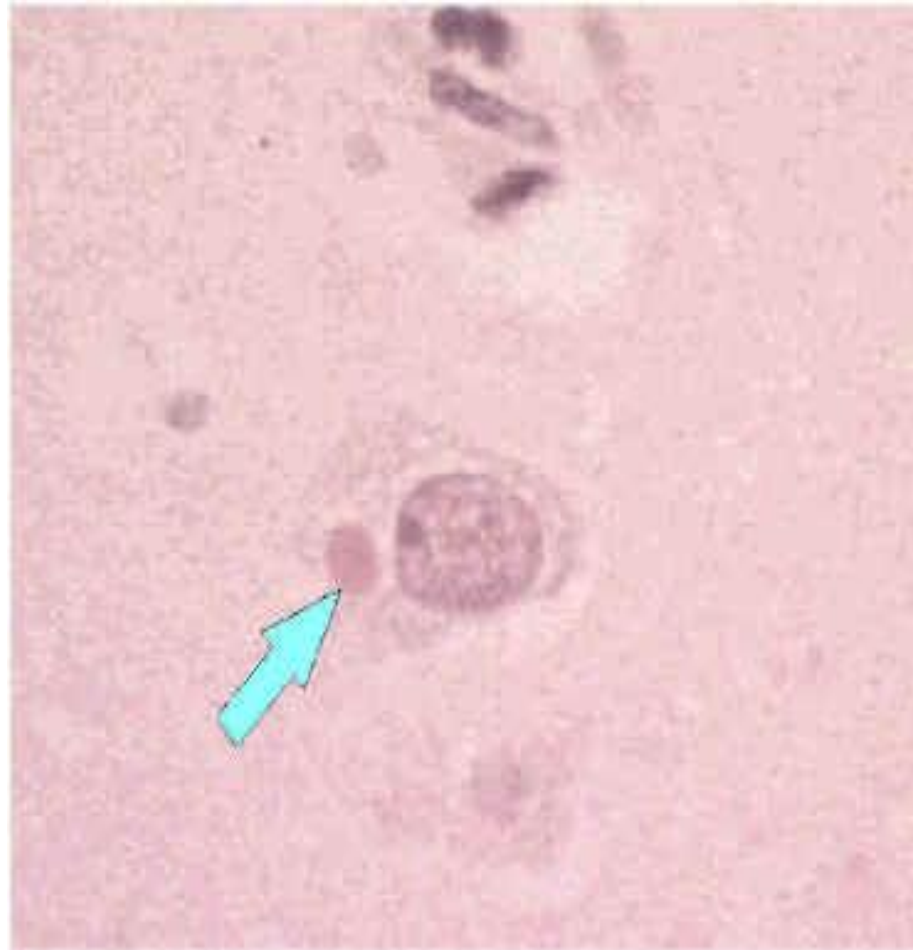
ЦПД АДЕНОВИРУСА (культура клеток HeLa)

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 при бешенстве





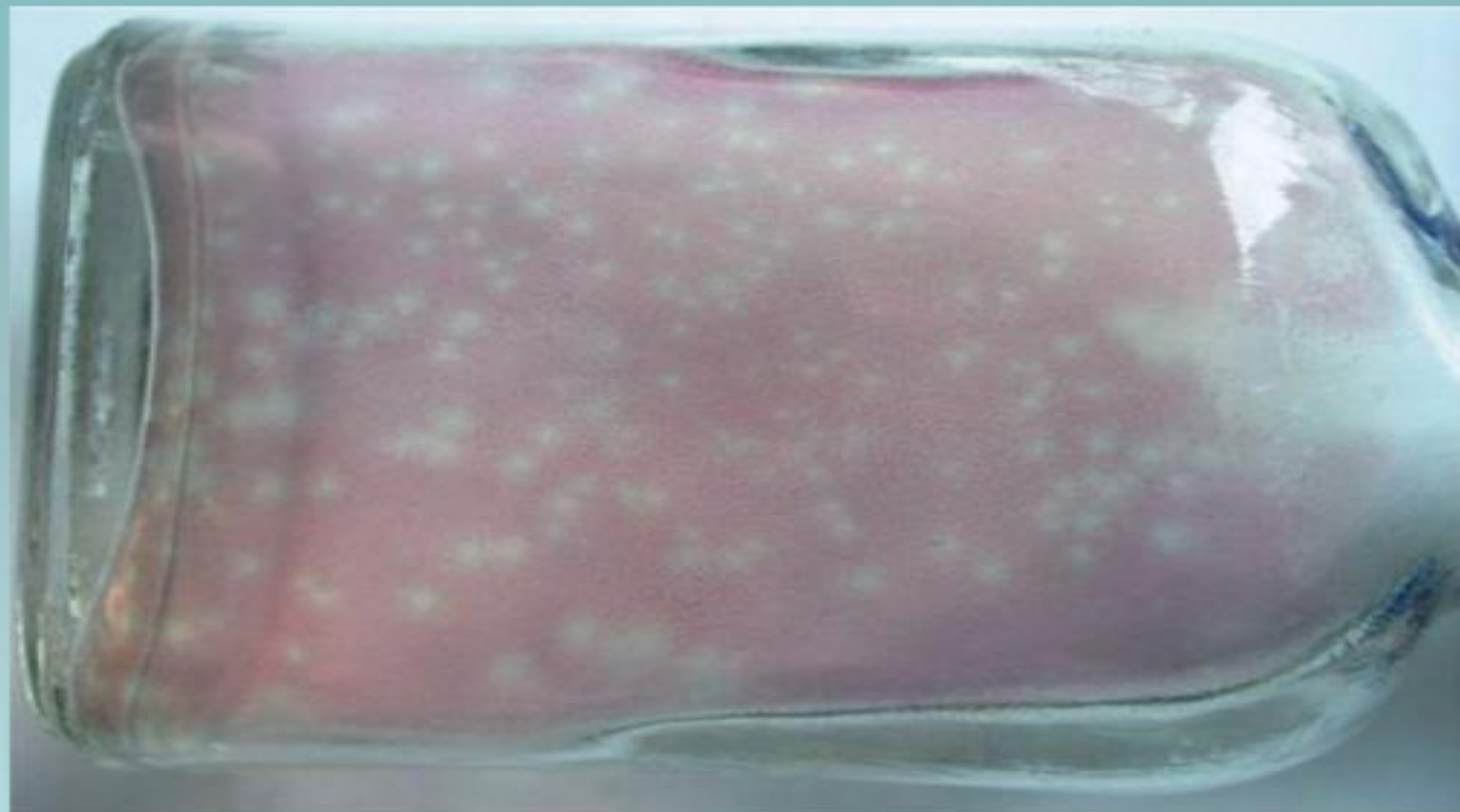
Многоядерные гигантские клетки с
внутриядерными включениями вирусов простого
герпеса

Бляшки, или “негативные” колонии

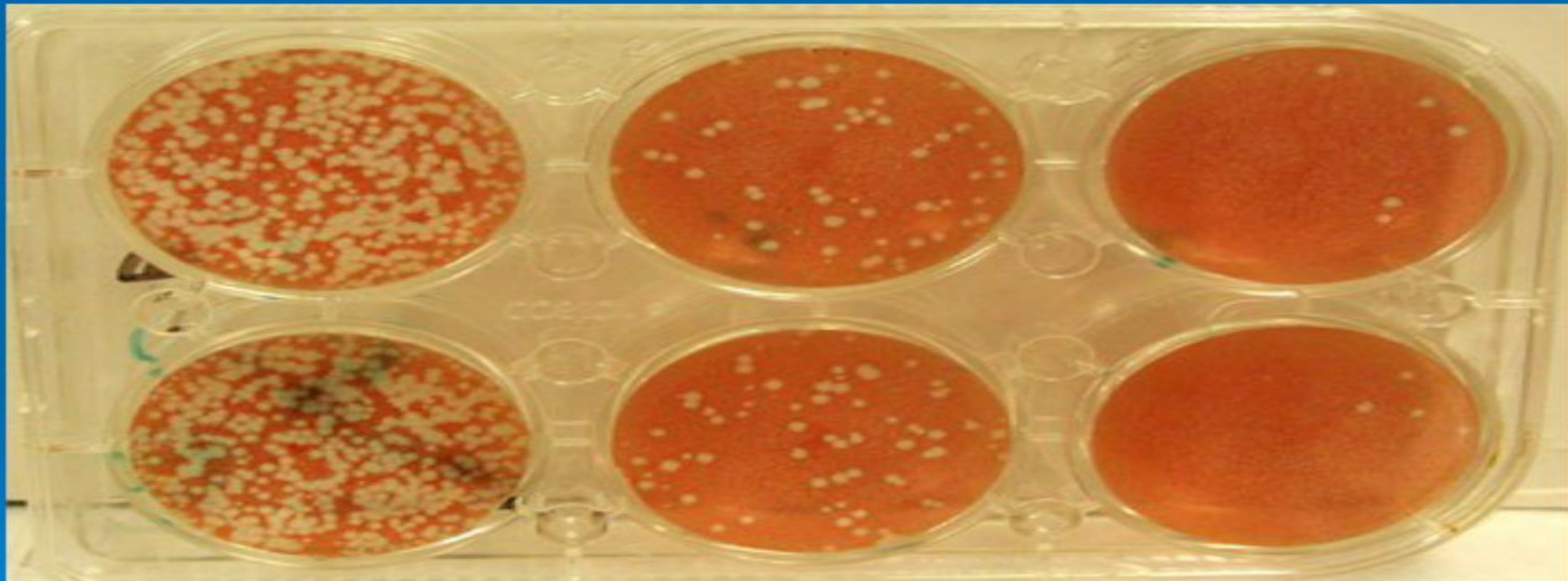
= ограниченные участки разрушенных вирусами клеток, культивируемых на питательной среде под агаровым покрытием, видимые как светлые пятна на фоне окрашенных живых клеток.

- 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

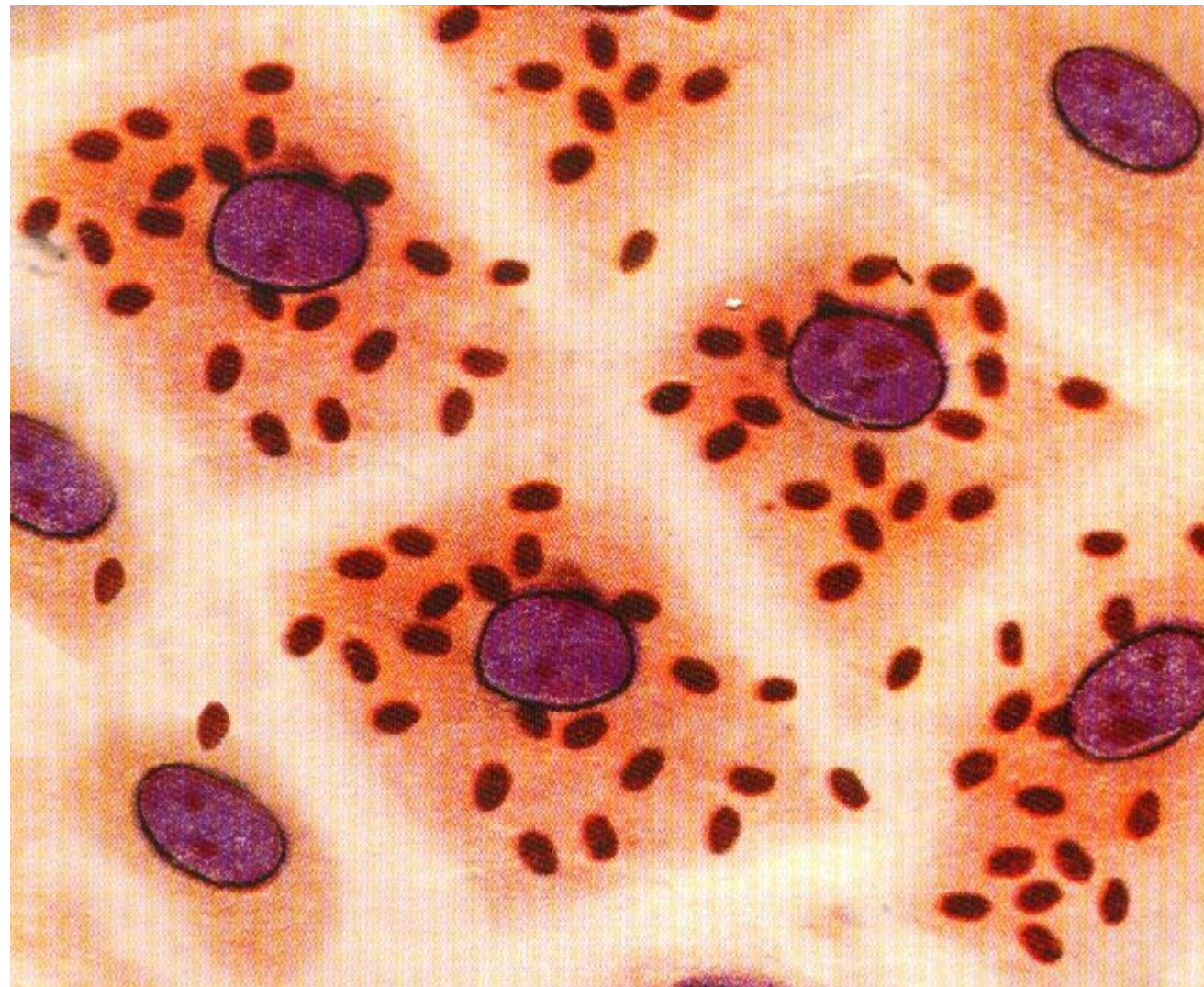


Бляшки под агаровым слоем



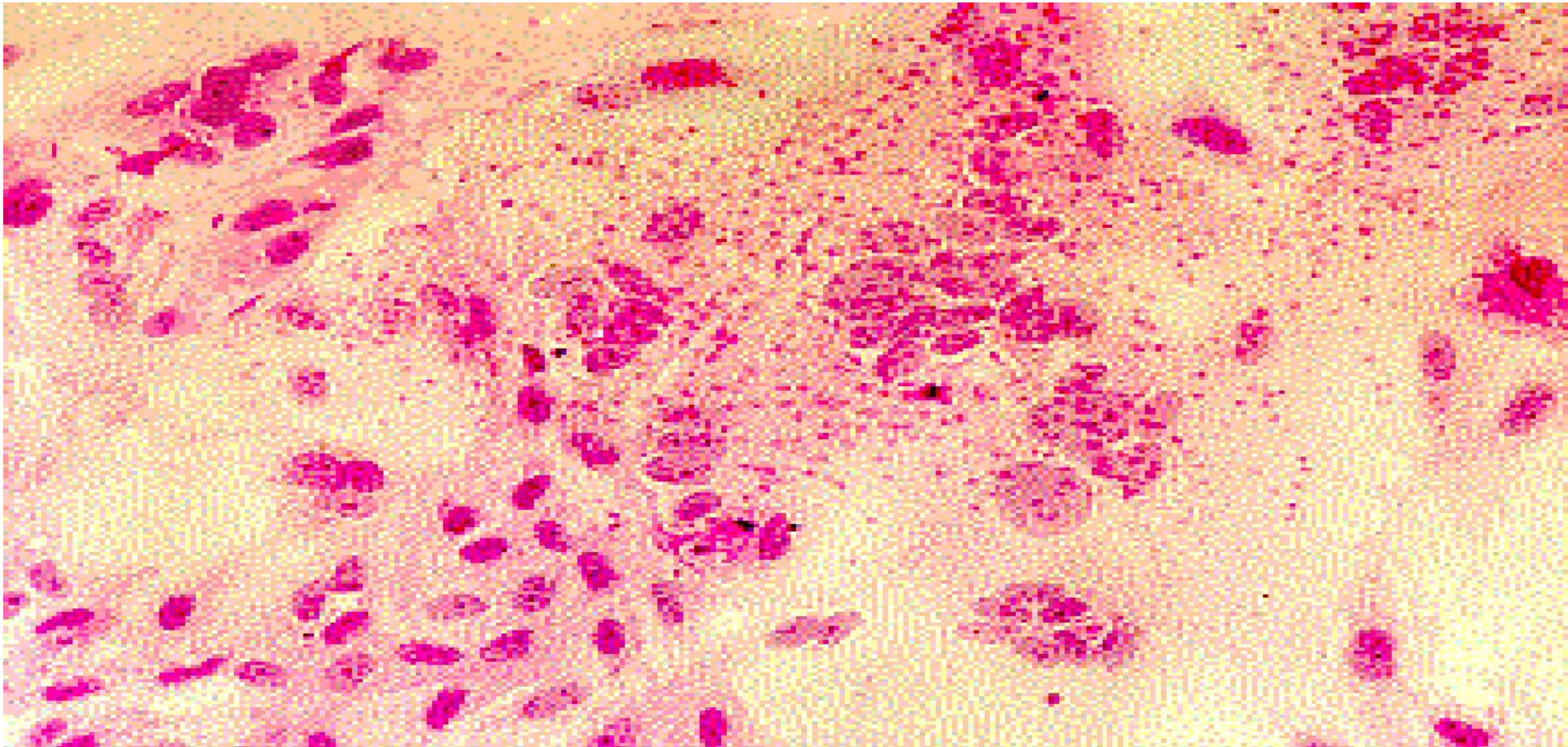
Реакция гемагглютинации (РГА)

- 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)

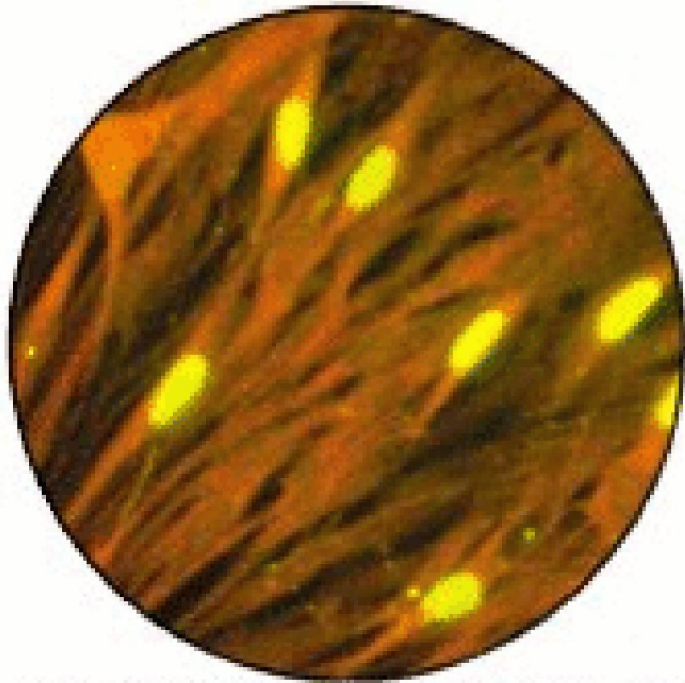


Fig. 2, CMV centrifugation culture fixed and stained 16 hrs after inoculation showing viral proteins in nuclei of infected human fibroblast cells

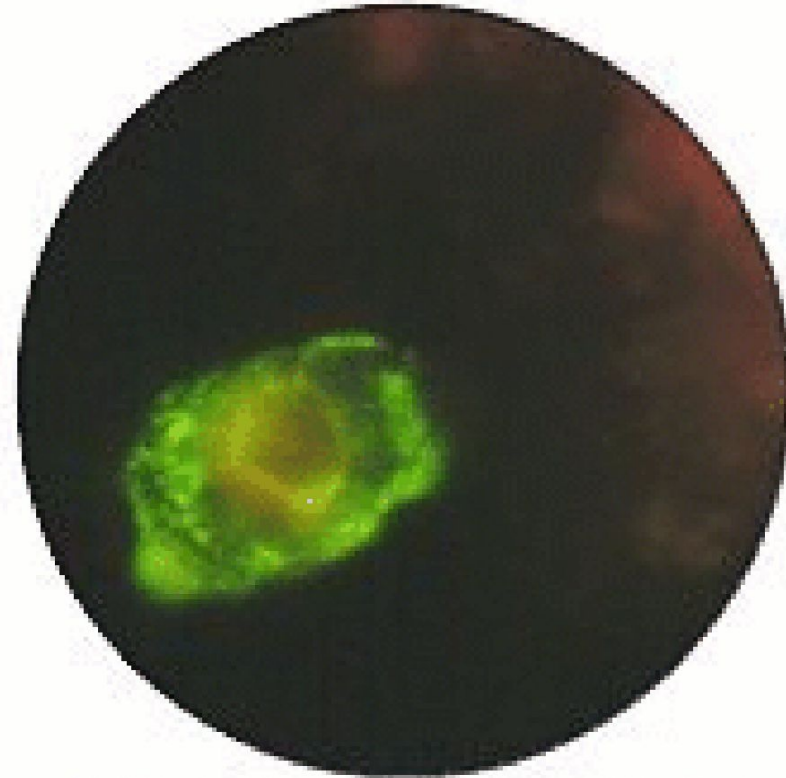


Fig. 3, HSV-infected epithelial cell from skin lesion (DFA)

Индикация вирусов в культуре клеток

- **«Цветная» проба:** живые клетки в процессе метаболизма → кислые продукты → изменение pH среды и цвета индикатора фенолового красного на **желтый**. При продукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается, клетки гибнут, и среда сохраняет свой первоначальный (**красный**) цвет.
- **Интерференция** – конкуренция между вирусами за клетку.



Цветные пробы

- Проба Солка



Идентификация вируса при выделении на культуре клеток

- РН (в т.ч. РТГАдс)
- РСК
- РИФ

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

Культивирование и индикация вирусов



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.