

# 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

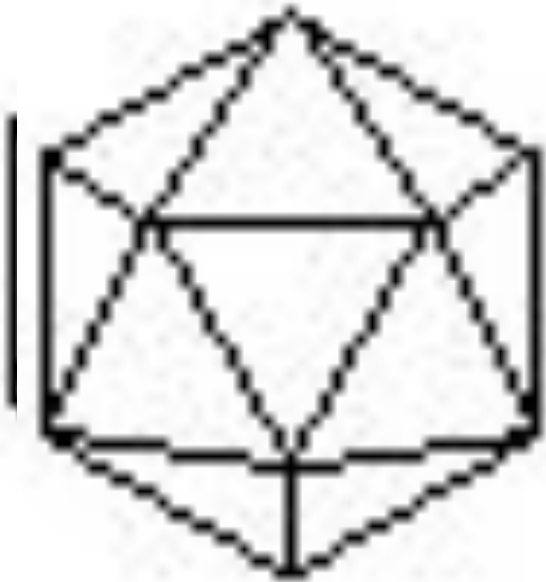
<b>ДНК-геномные вирусы</b>		
1цепь	2цепи	
простые	простые	сложные
<b>Parvoviridae</b>	<b>Adenoviridae</b> <b>Papovaviridae</b>	<b>Poxviridae</b> <b>Herpesviridae</b> <b>Hepadnaviridae</b>

# КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

## РНК- геномные вирусы (-viridae)

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

# Принцип строения вириона



простой:

**НК+ капсид = нуклеокапсид**



Сложный:

**нуклеокапсид +  
суперкапсид**

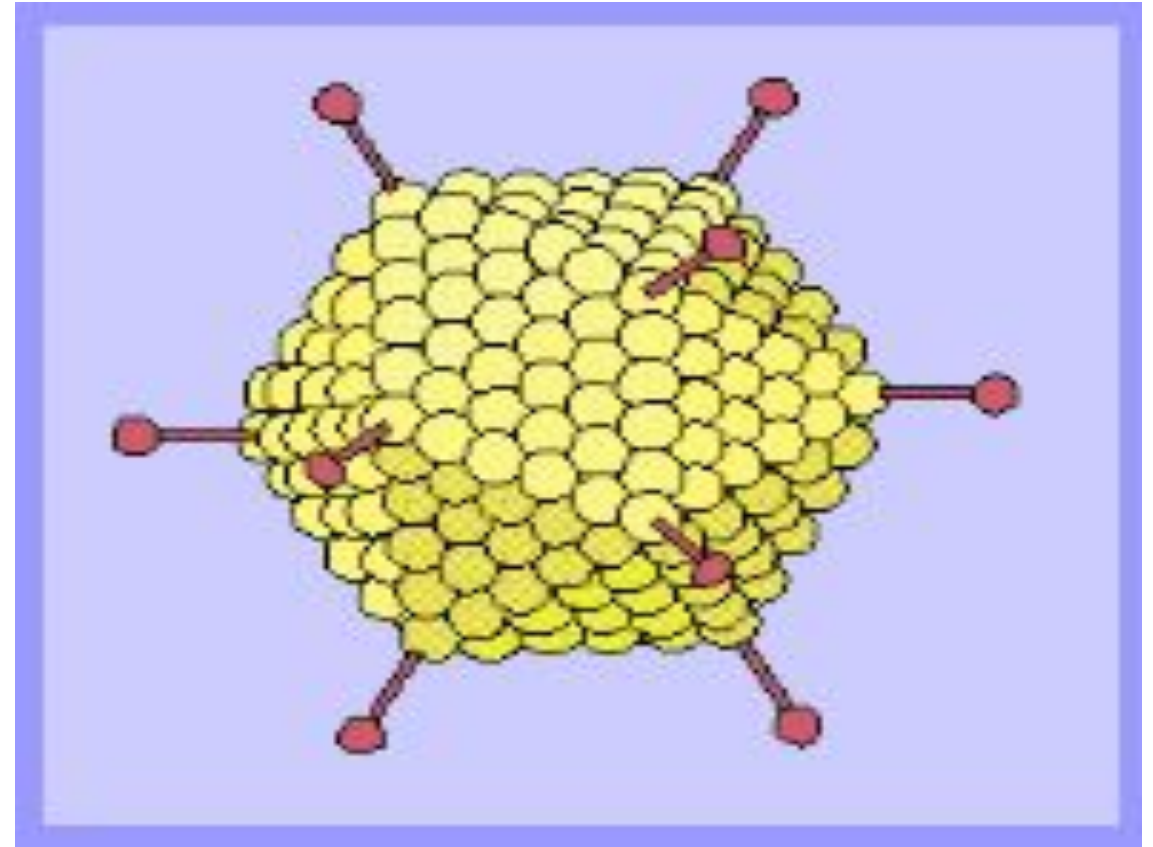


# Типы симметрии капсида

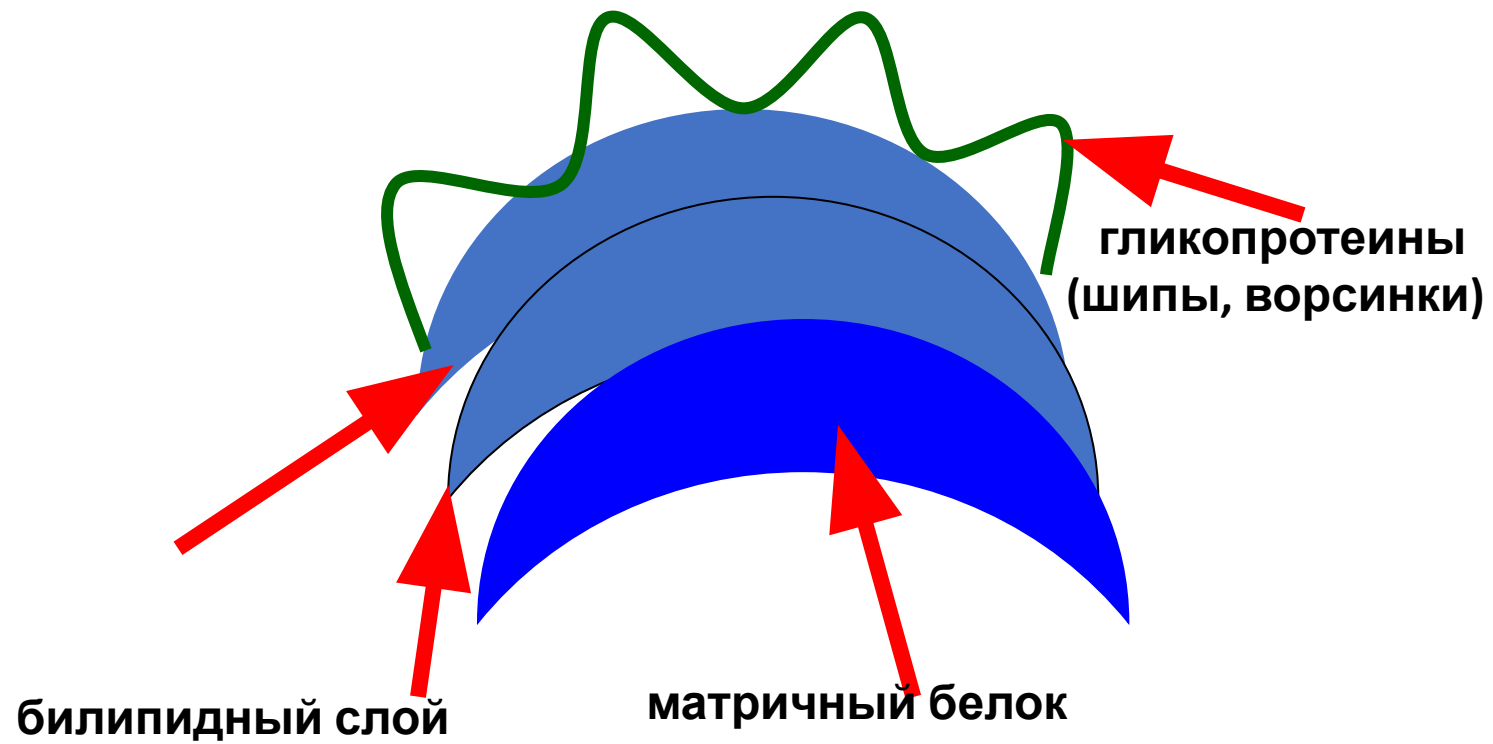
спиральная



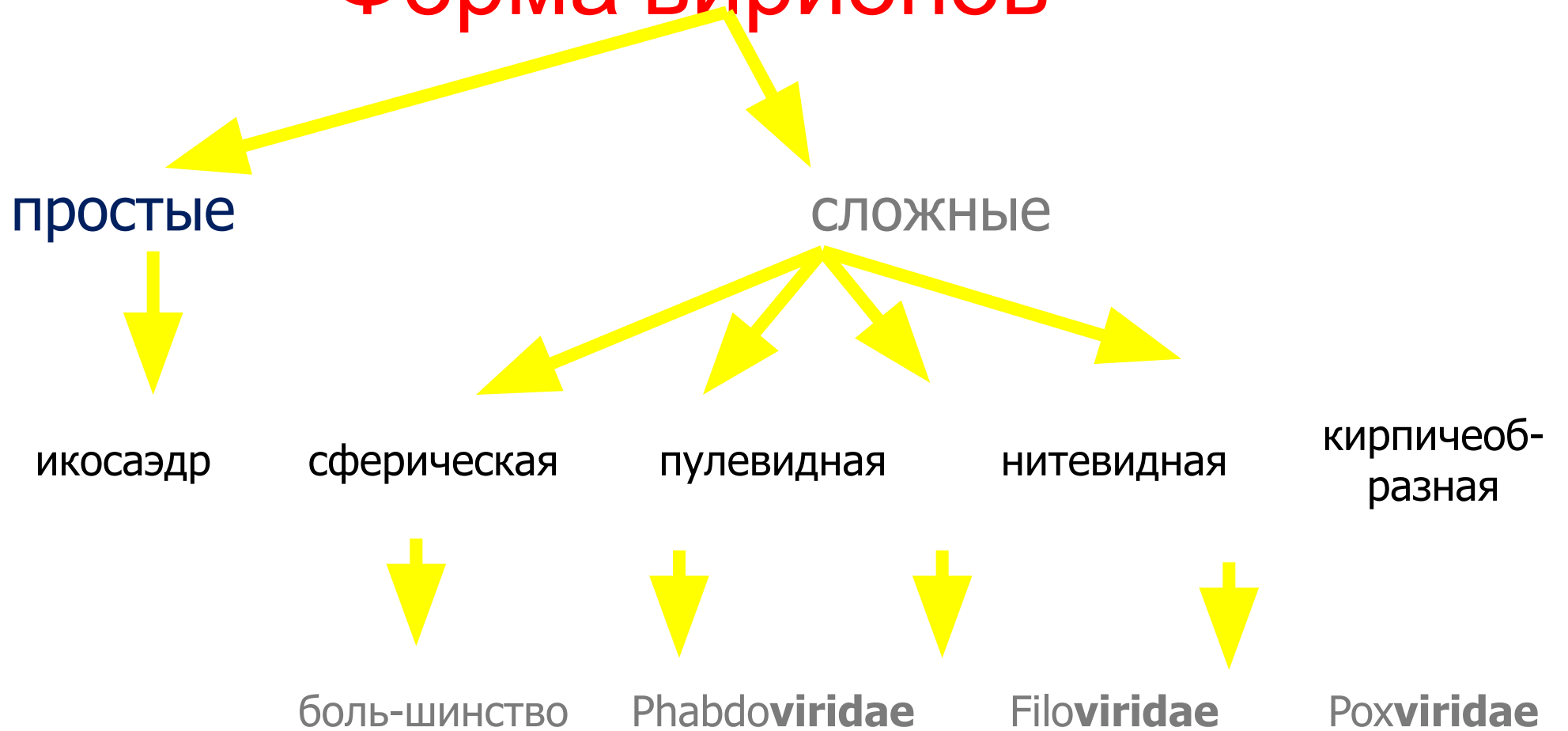
кубическая



# 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)

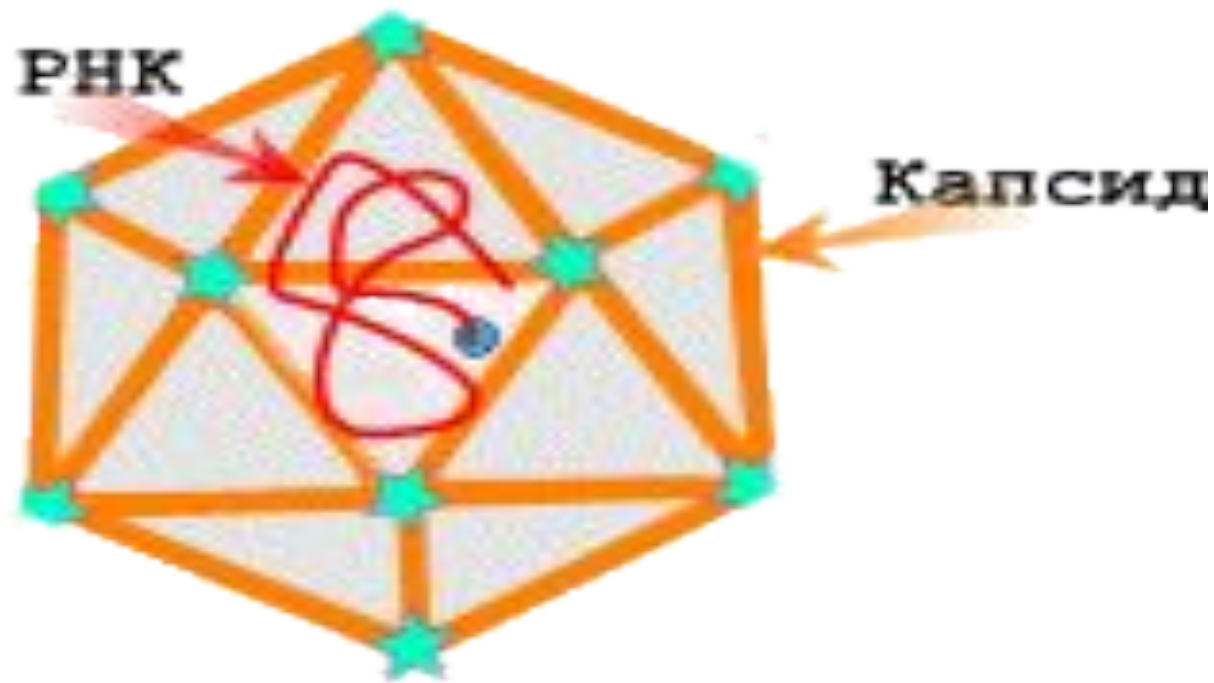
- Вирионные,
- Вирусиндуцированные,
- Вирус может модифицировать клеточные ферменты.

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



# Схема строения вируса гепатита А

(вирус имеет однонитевую +РНК)

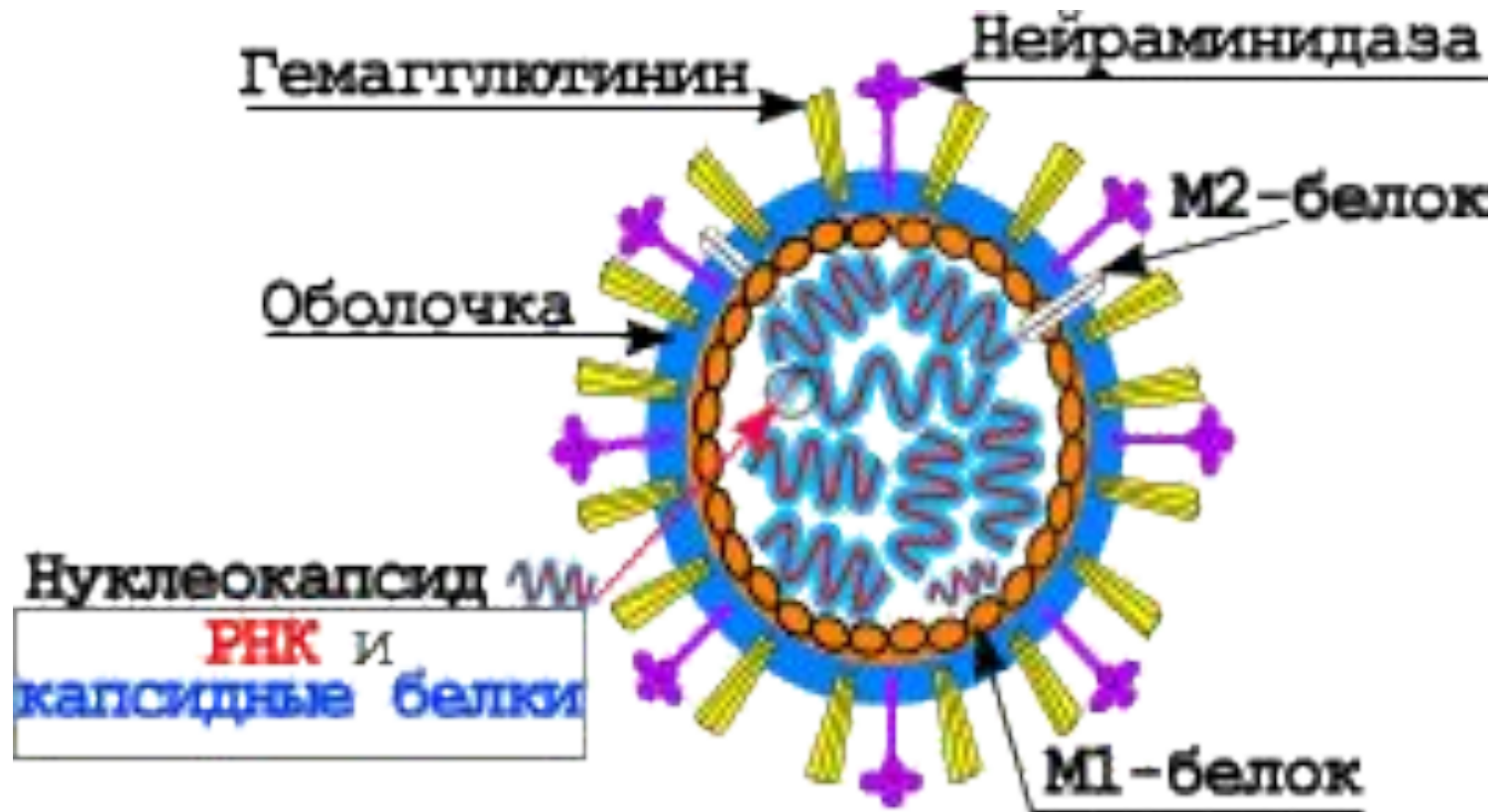




# Схема строения сложноустроенного вириона= вируса герпеса (вирус с линейной двухнитевой ДНК)



# 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.

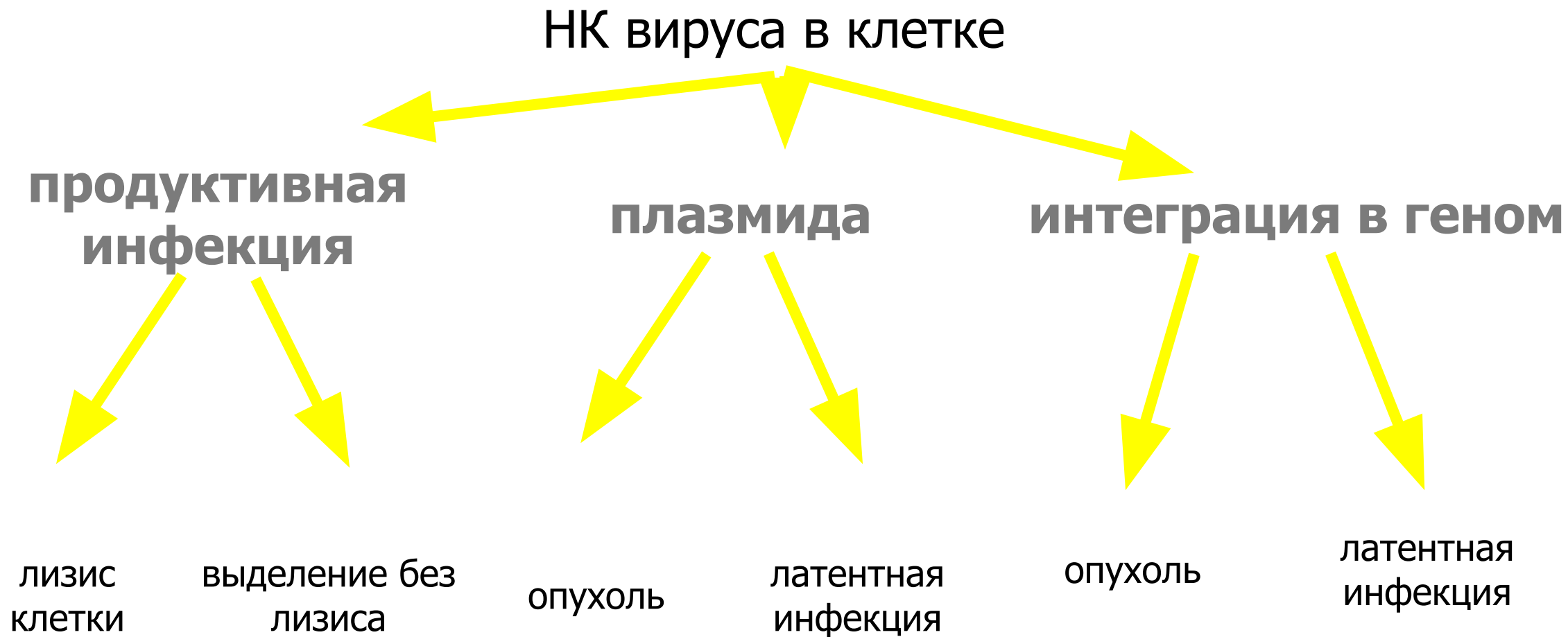
### Например,

- 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. абортивный 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. Депротенизация 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*

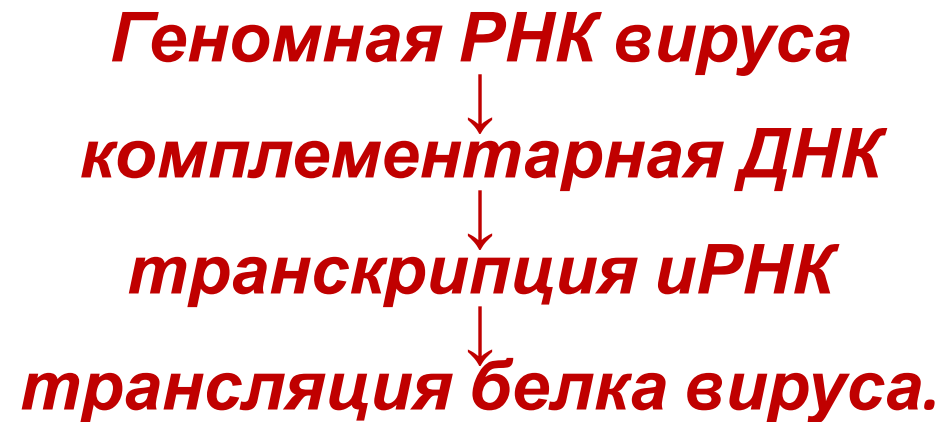
## 3.1.г. Синтез вирусных белков - варианты:

### 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 вирусе-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)



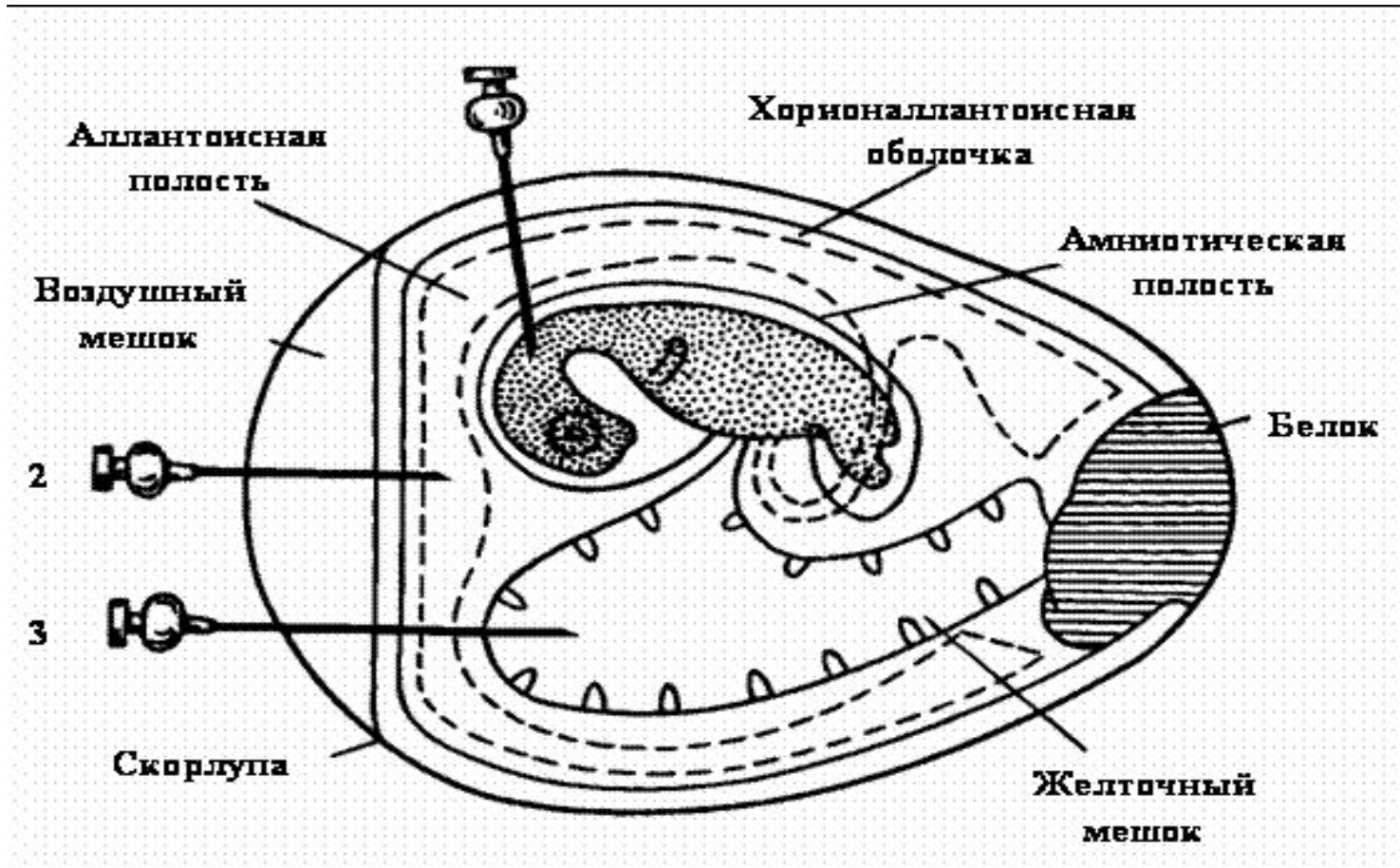
# Использование для вирусологического метода куриного эмбриона



# 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;

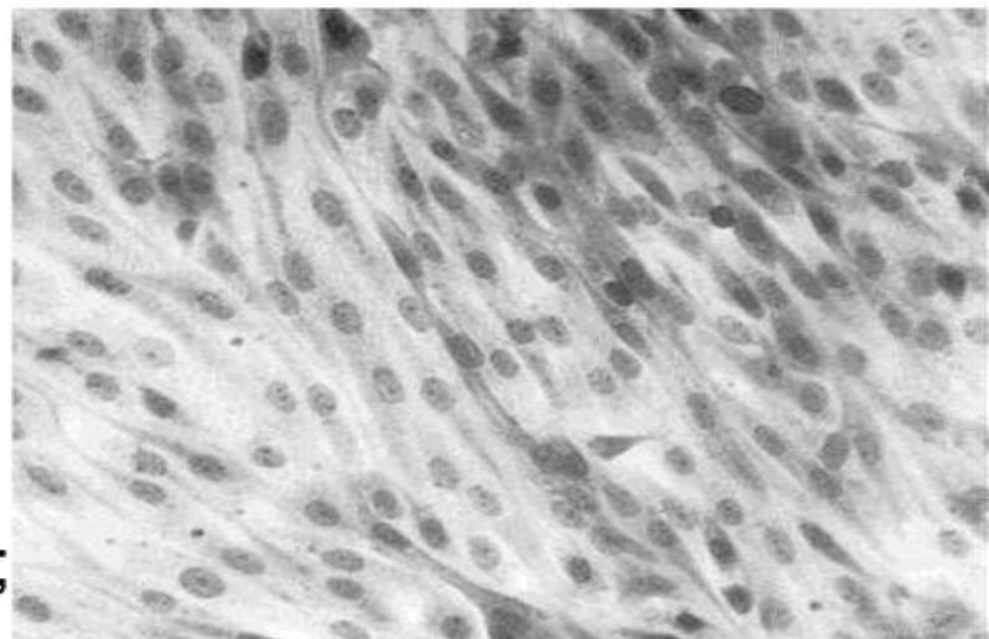
б) **по происхождению:**

- 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.



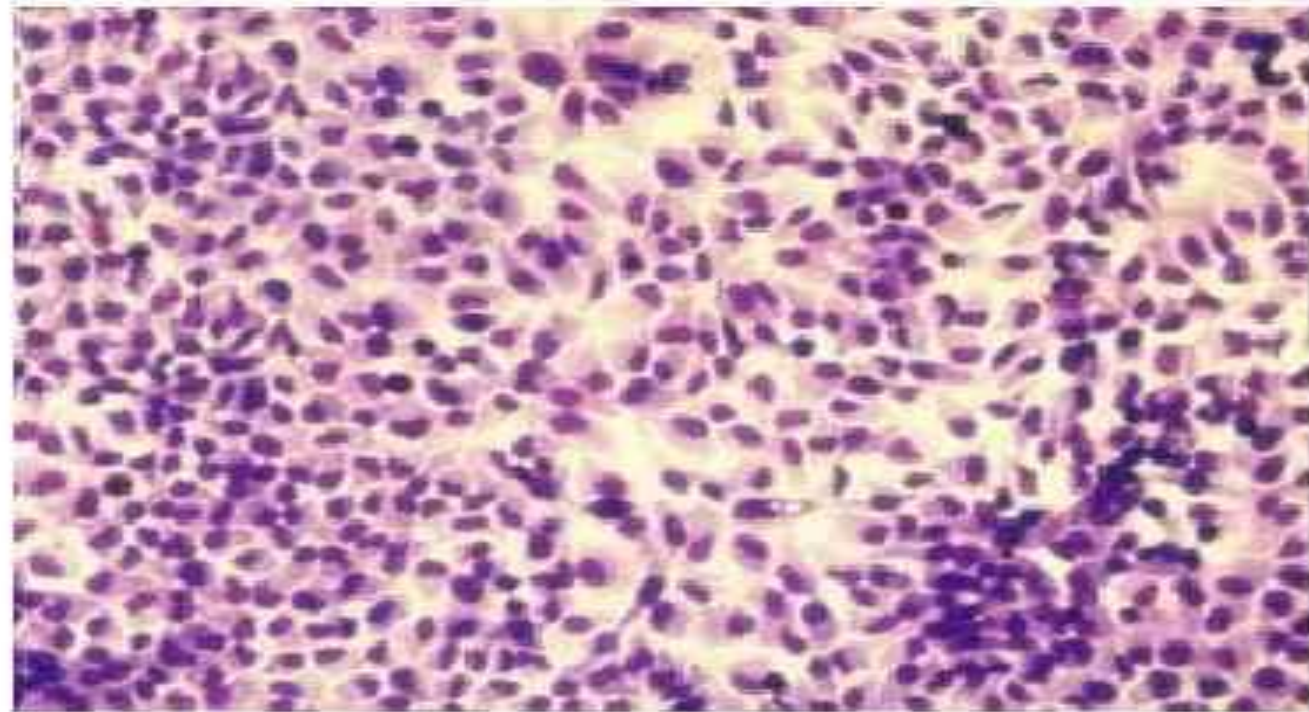


# Первичные (эмбриональные) культуры клеток

- 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

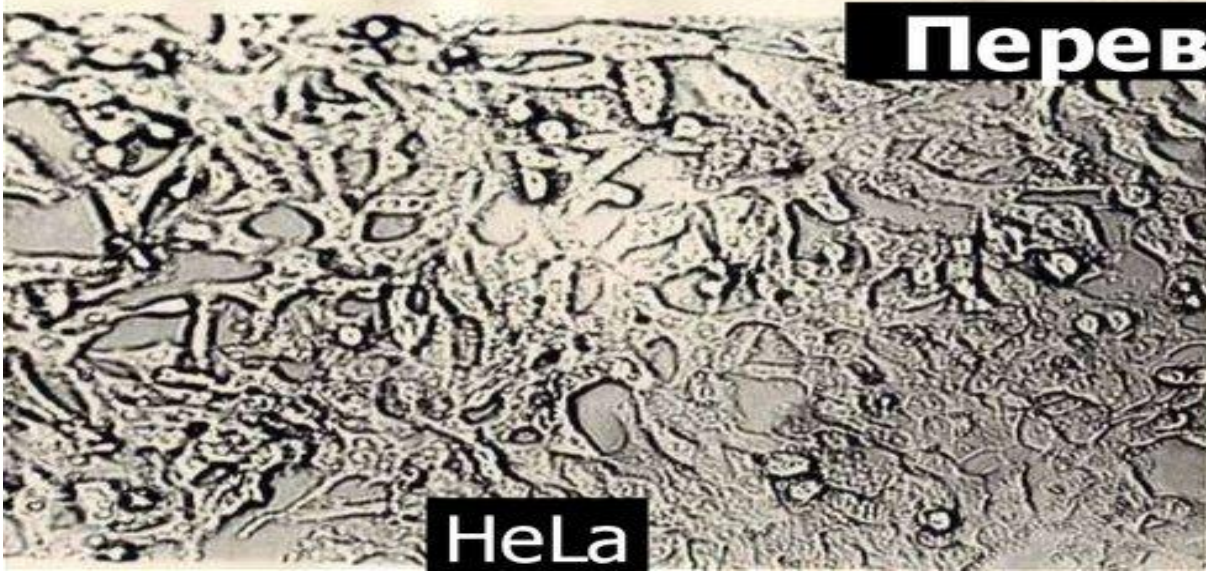


ФЭК

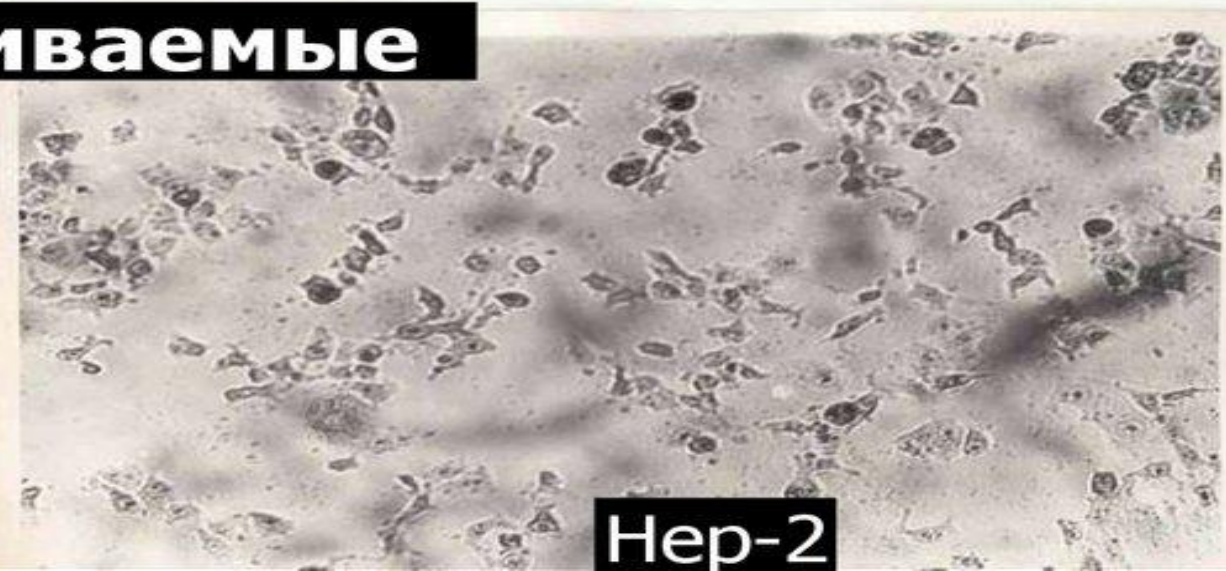


ФЭЧ

## 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



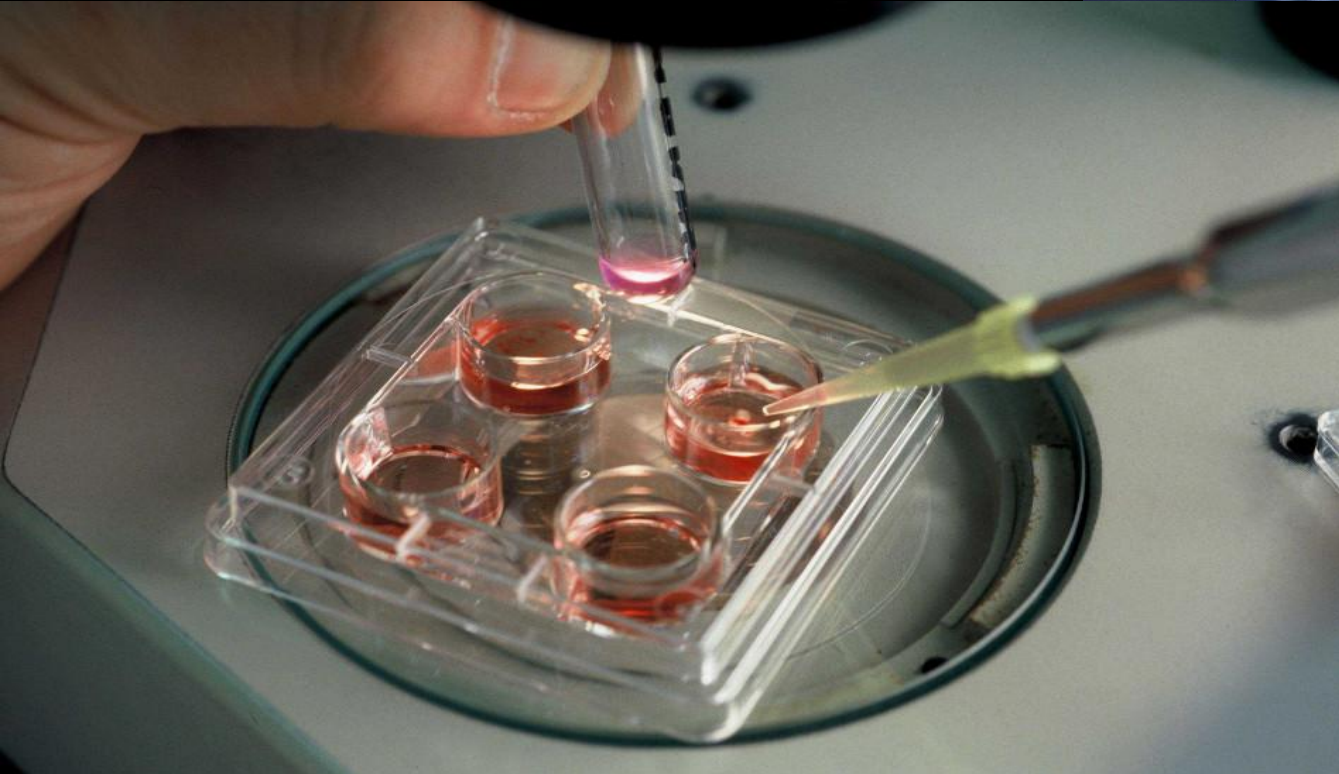
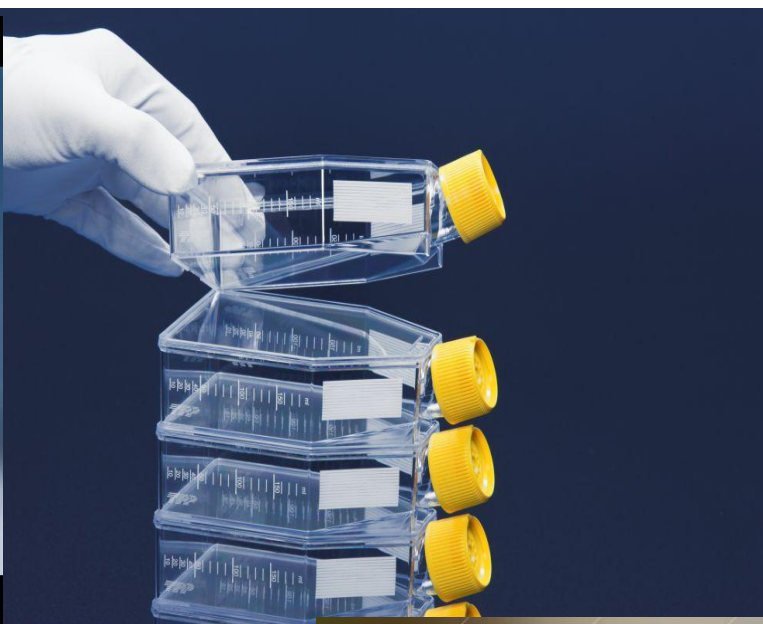
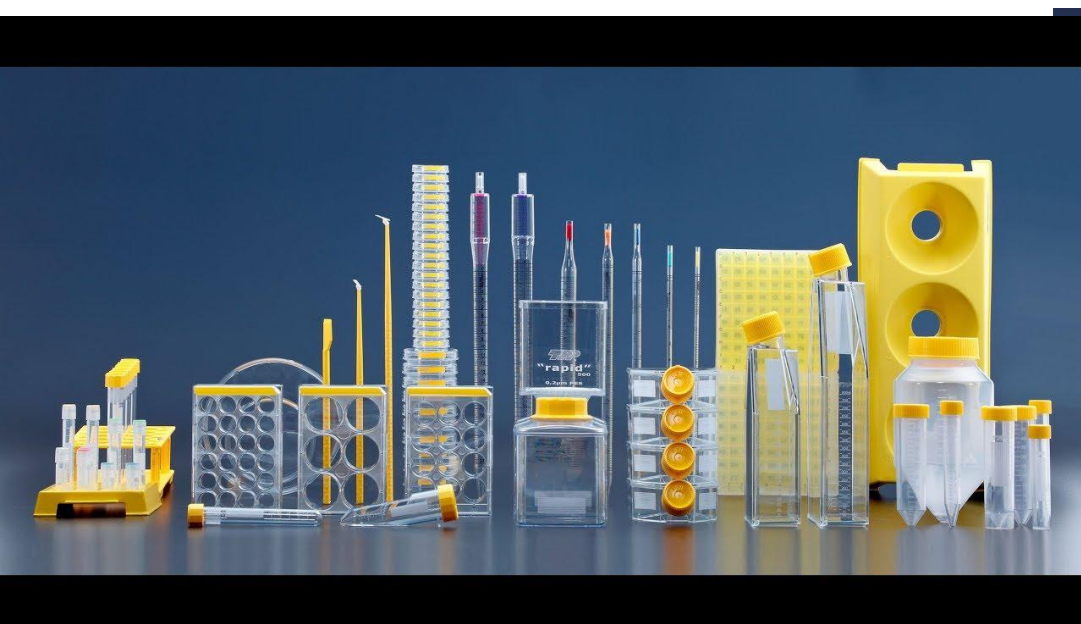


**Роллеры и матрасы (многоразового и одноразового использования) для культивирования вирусов в монослое культур клеток**

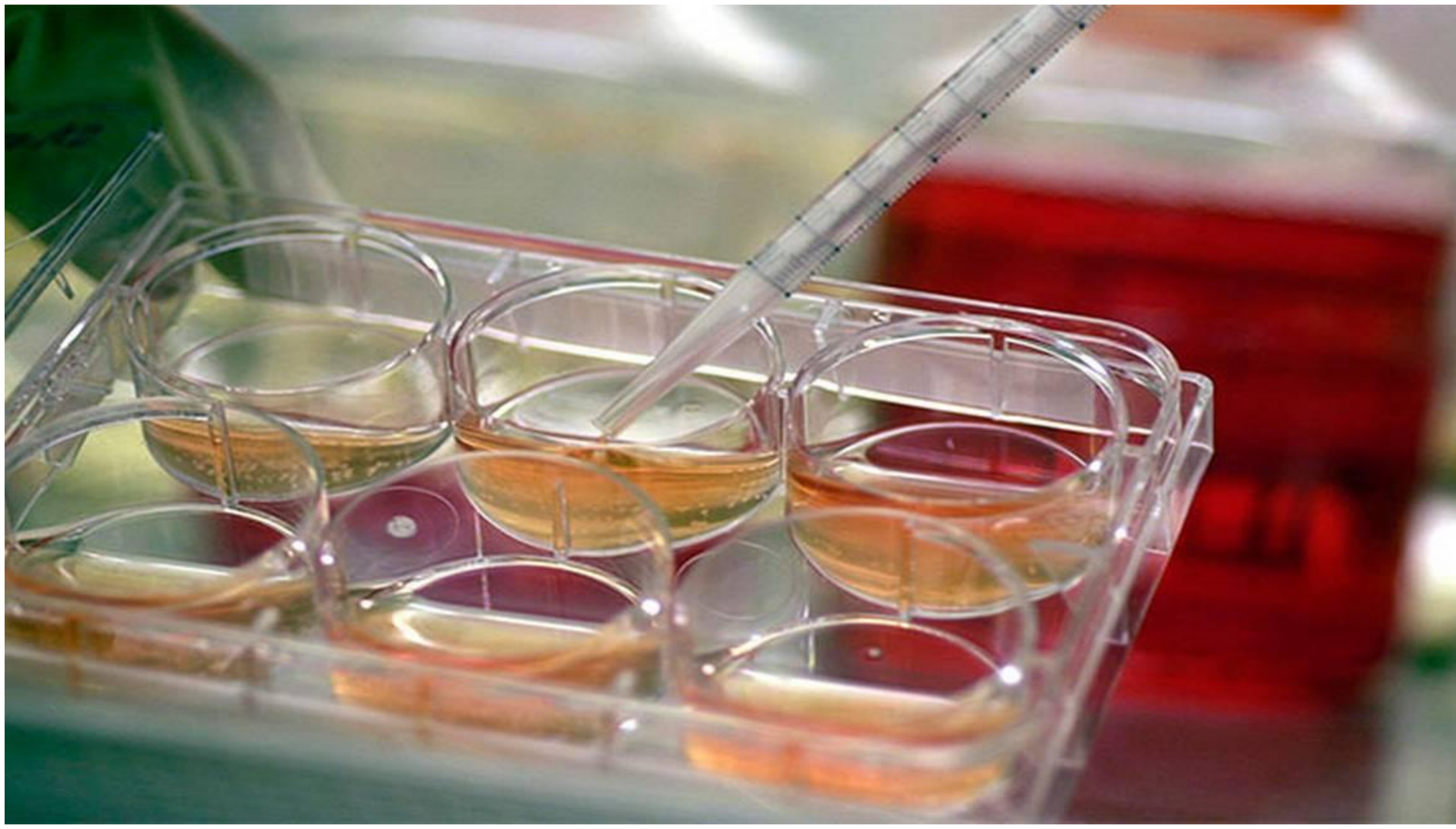
34













# 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

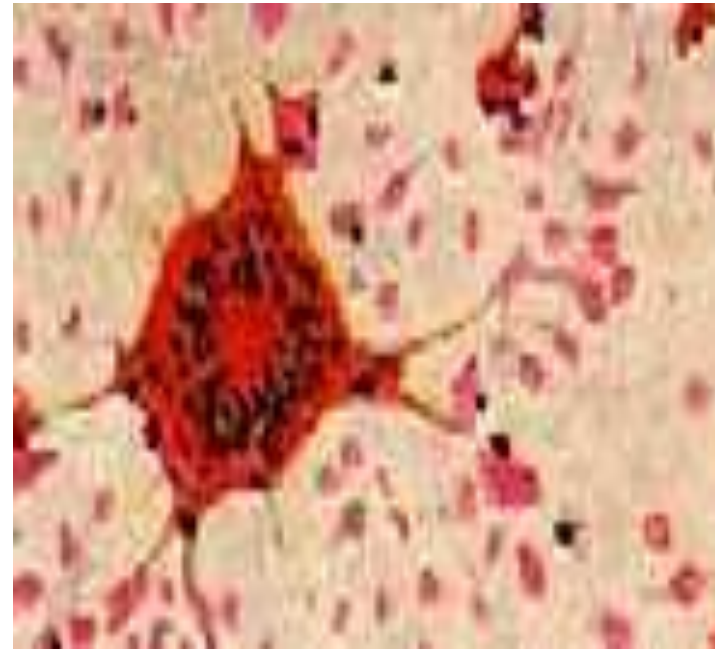
- проводят на основе следующих феноменов:
  - **цитопатогенного действия (ЦПД)** вирусов или цитопатического эффекта (ЦПЭ),
  - образования внутриклеточных включений,
  - образования “бляшек”,
  - реакции гемагглютинации, гемадсорбции или “цветной” реакции.

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

**Культура клеток**



**ЦПД вируса**



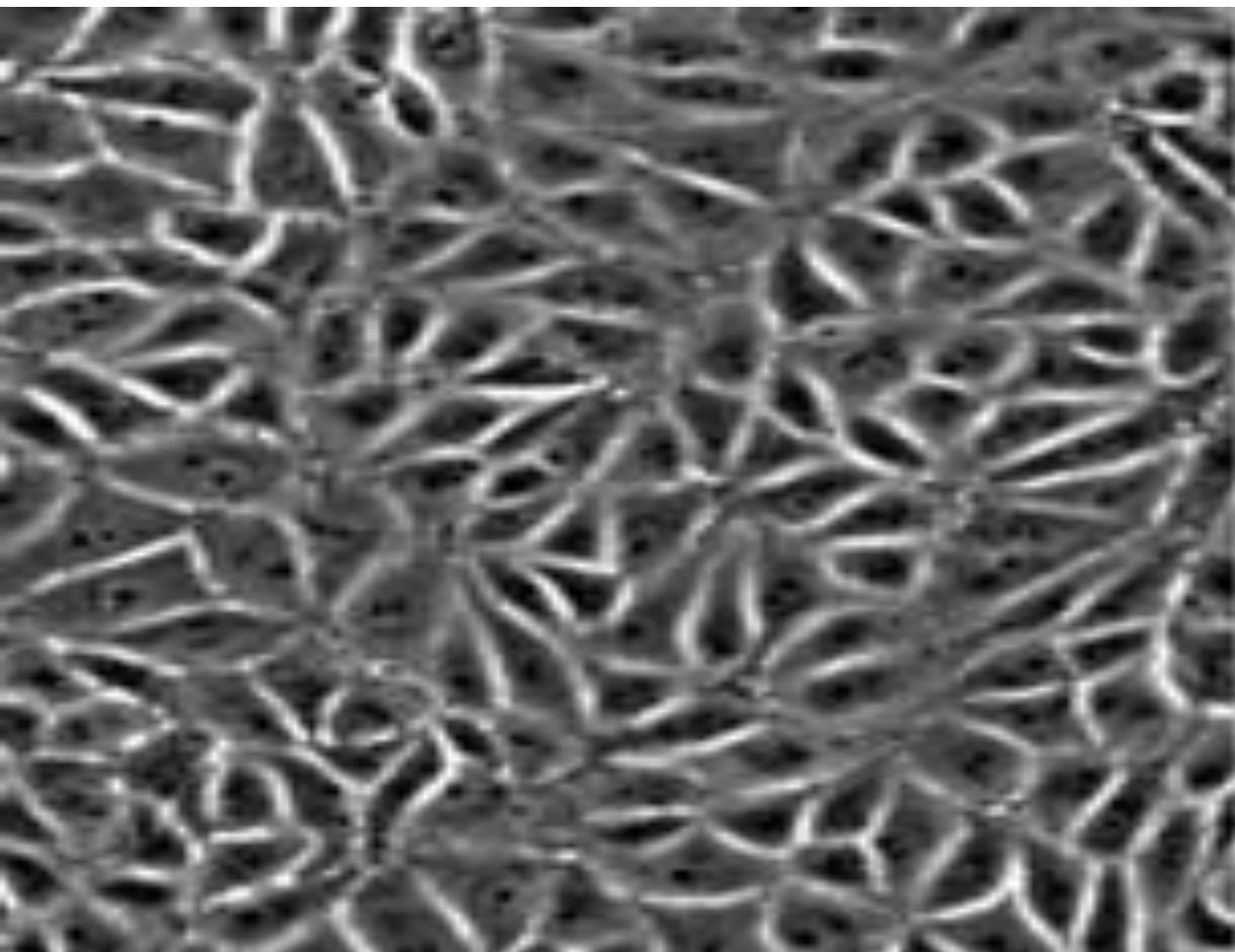
# Виды ЦПД

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

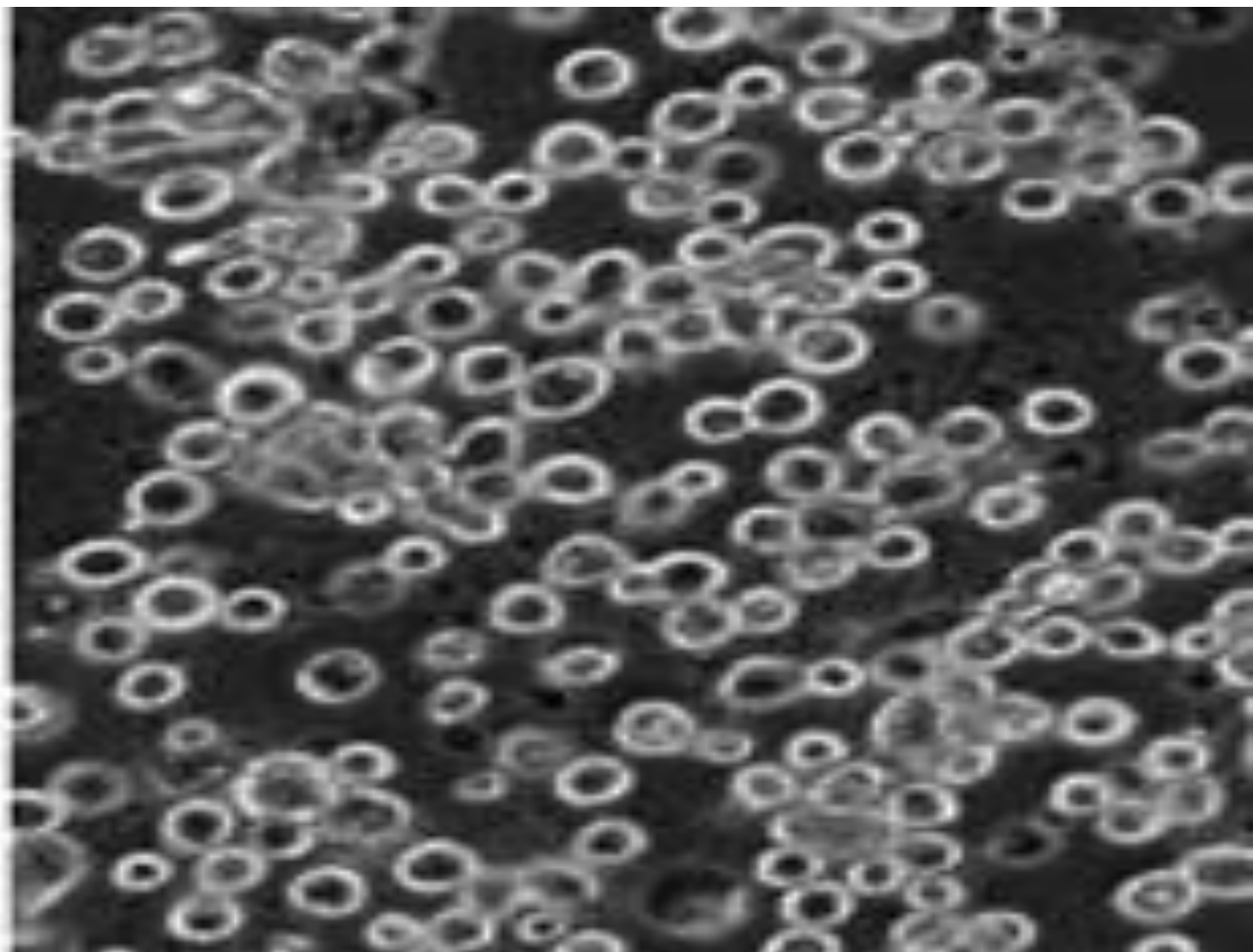


# ЦПД вируса полиомиелита

Культура клеток до заражения

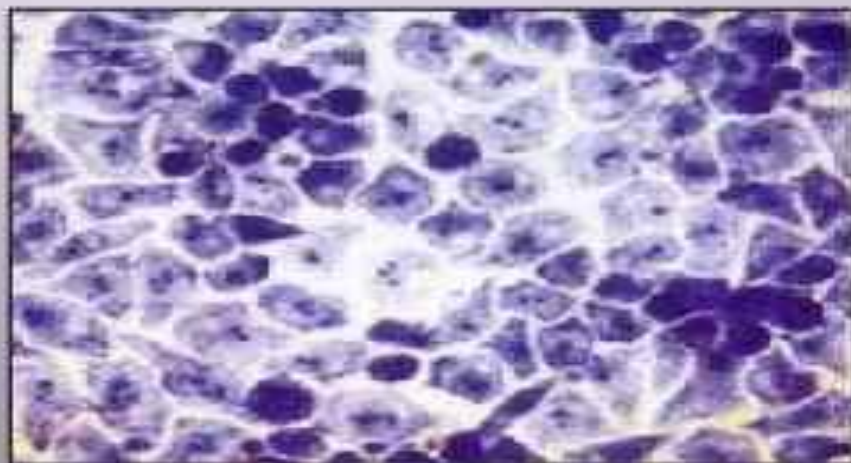


ЦПД



## ЦПД в культуре клеток Нер-2

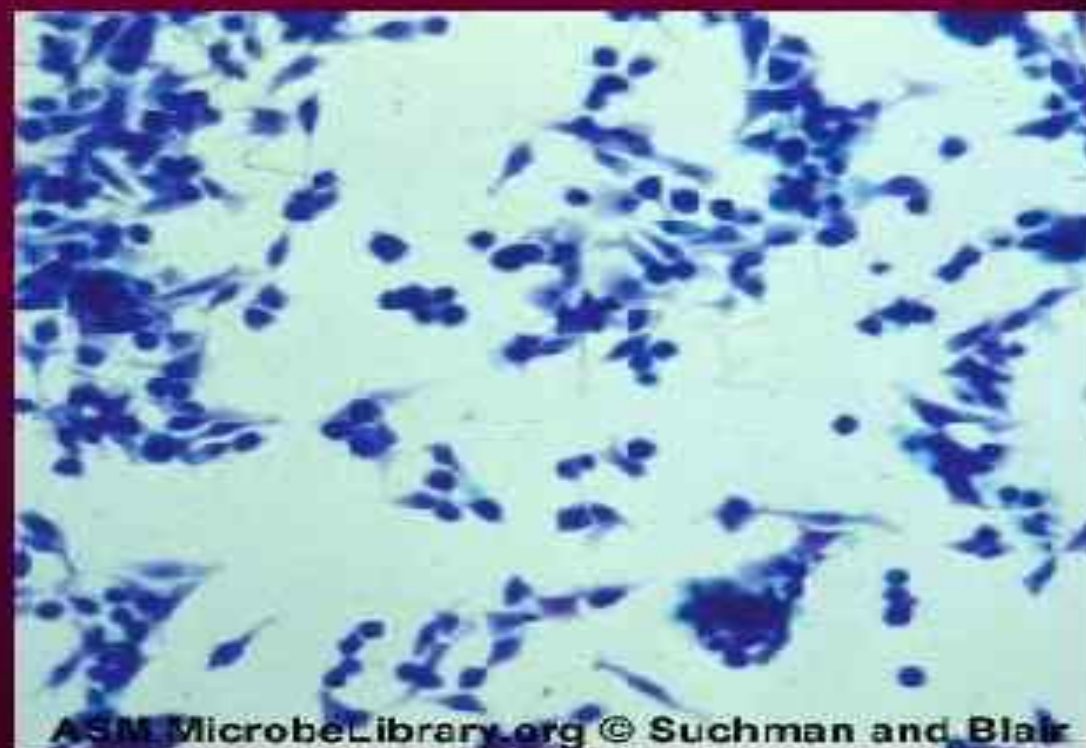
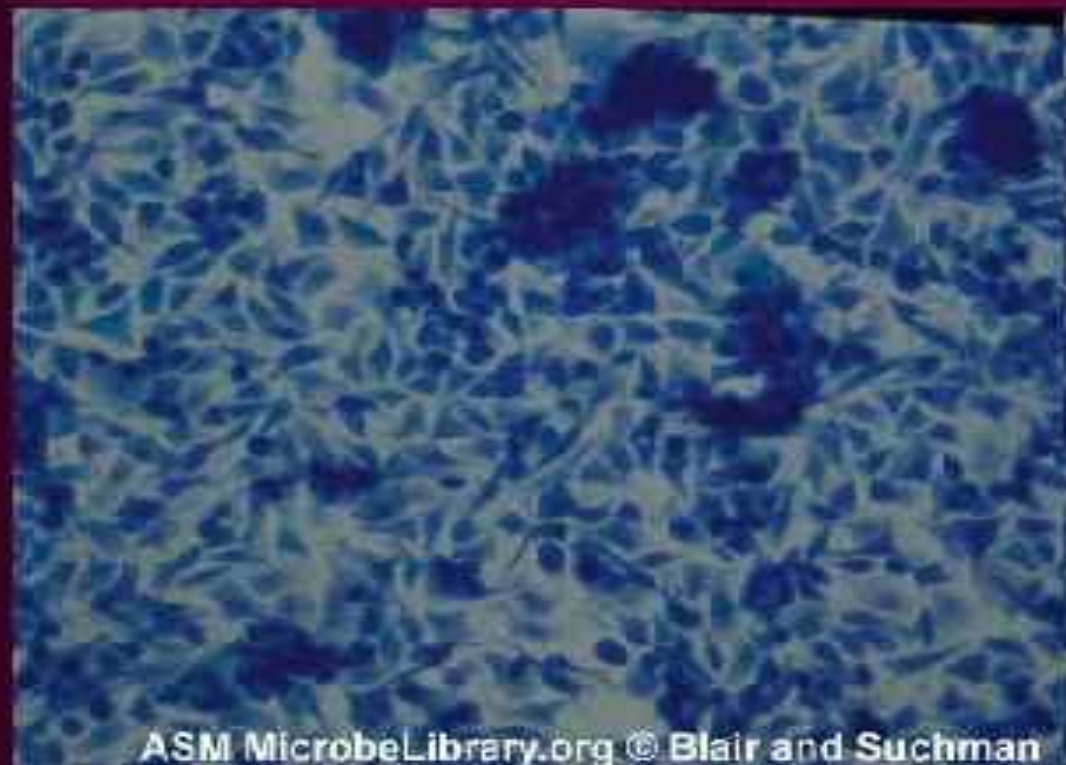
ДО ЗАРАЖЕНИЯ  
ВИРУСОМ



НА 3-И СУТКИ ПОСЛЕ  
ЗАРАЖЕНИЯ







**Интakтная культура клеток**

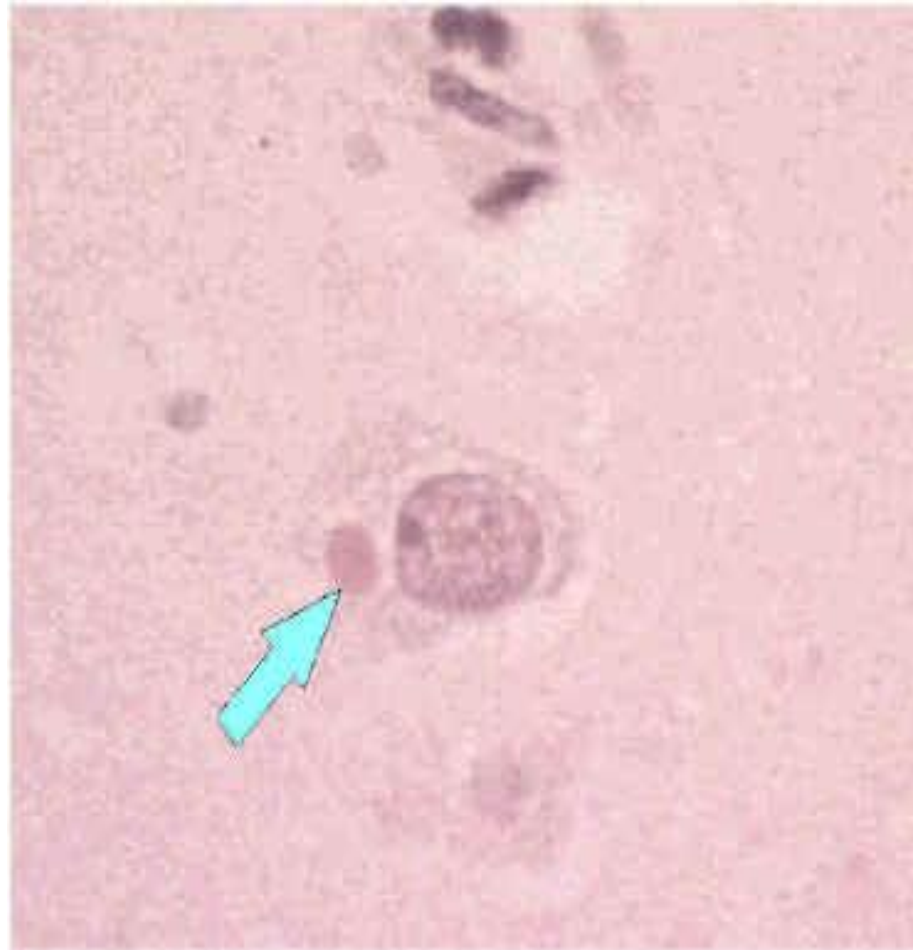
**ЦПД АДЕНОВИРУСА (культура клеток HeLa)**

# 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







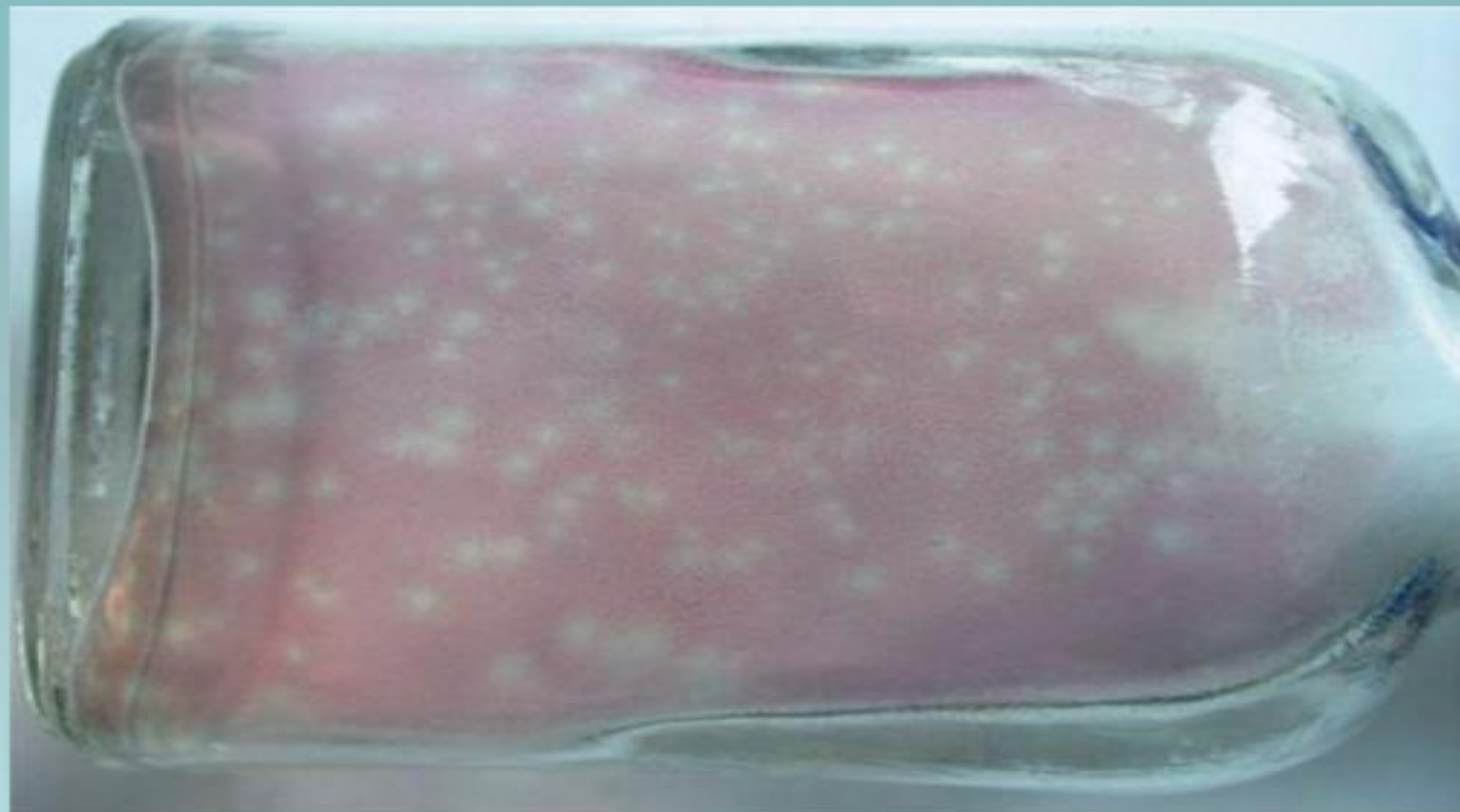
Многоядерные гигантские клетки с  
внутриядерными включениями вирусов простого  
герпеса

# 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.

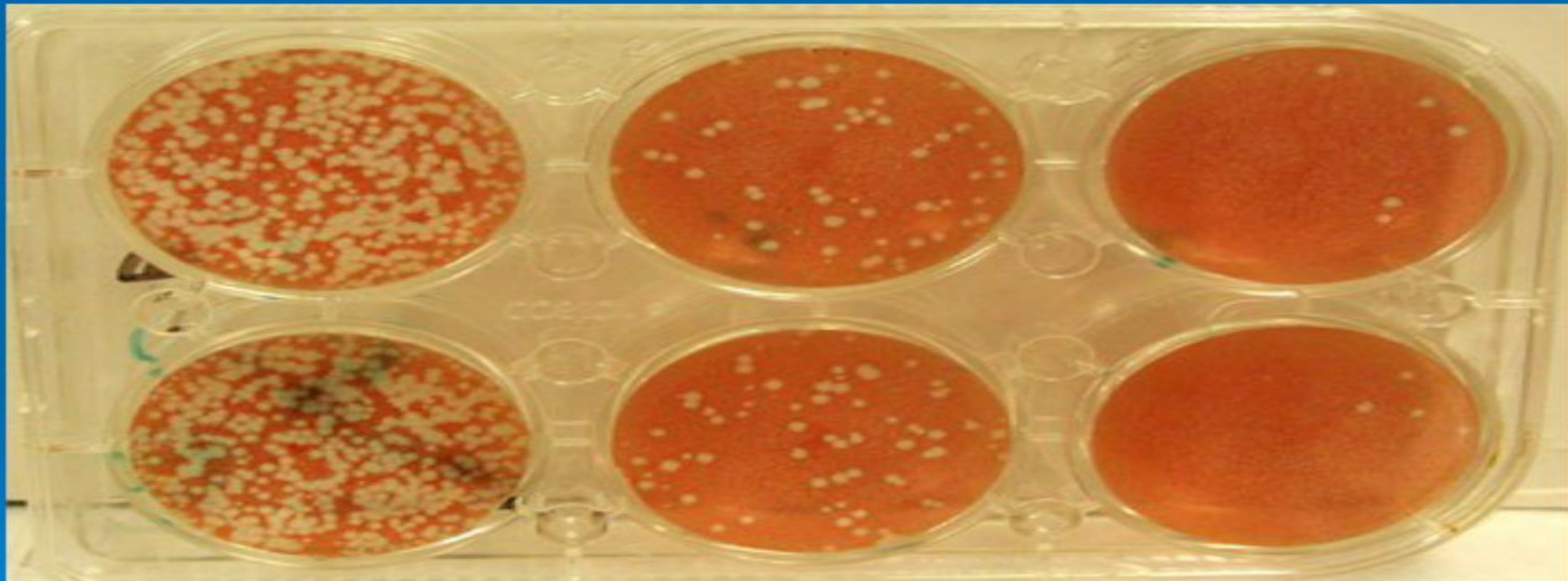
- Один вирион образует потомство в виде одной бляшки.
- “Негативные” колонии разных вирусов отличаются по размеру, форме, поэтому метод бляшек используют для дифференциации вирусов, а также для определения их концентрации.

# Негативные колонии на культуре клеток





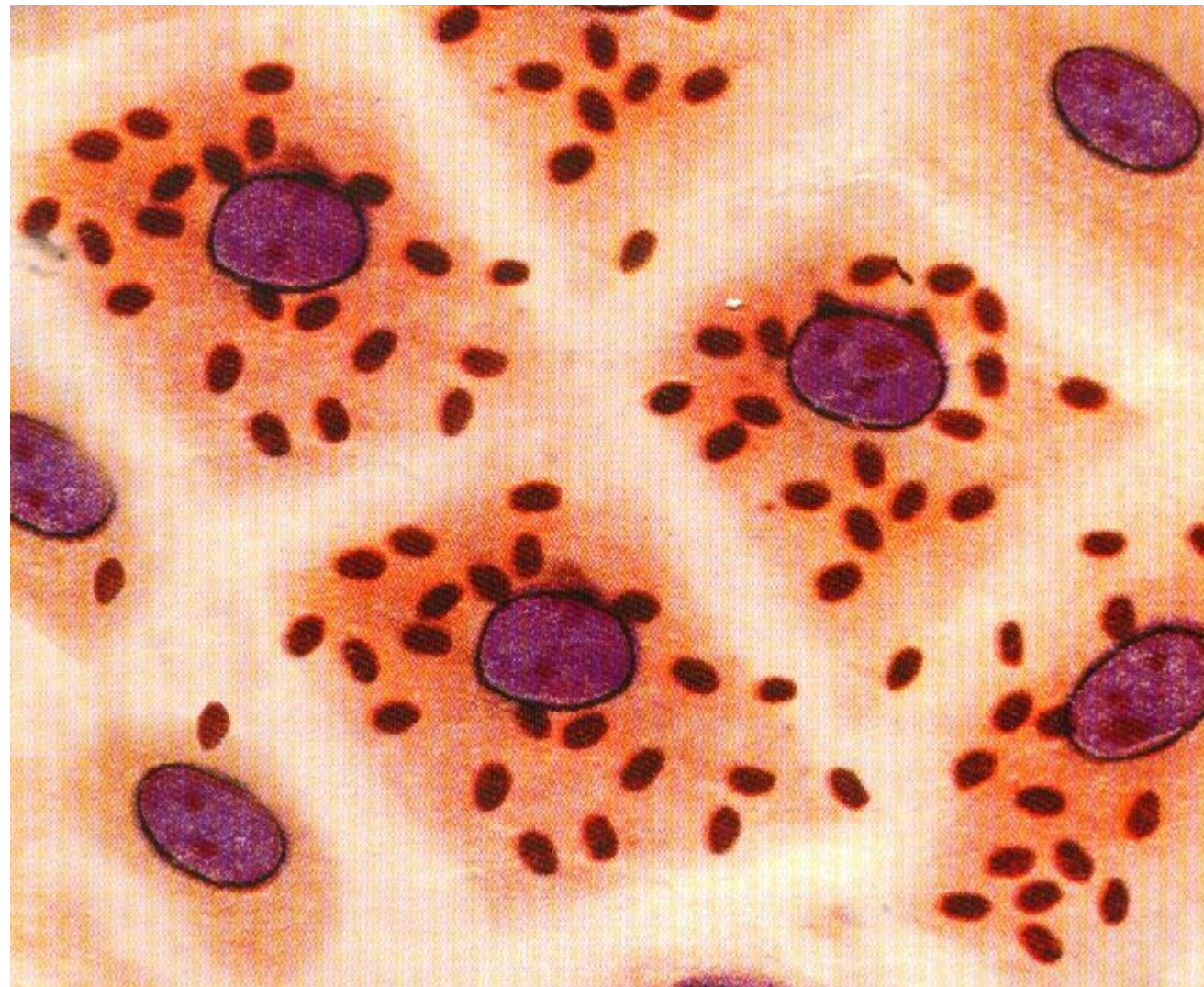
# Бляшки под агаровым слоем





# Реакция гемагглютинации (РГА)

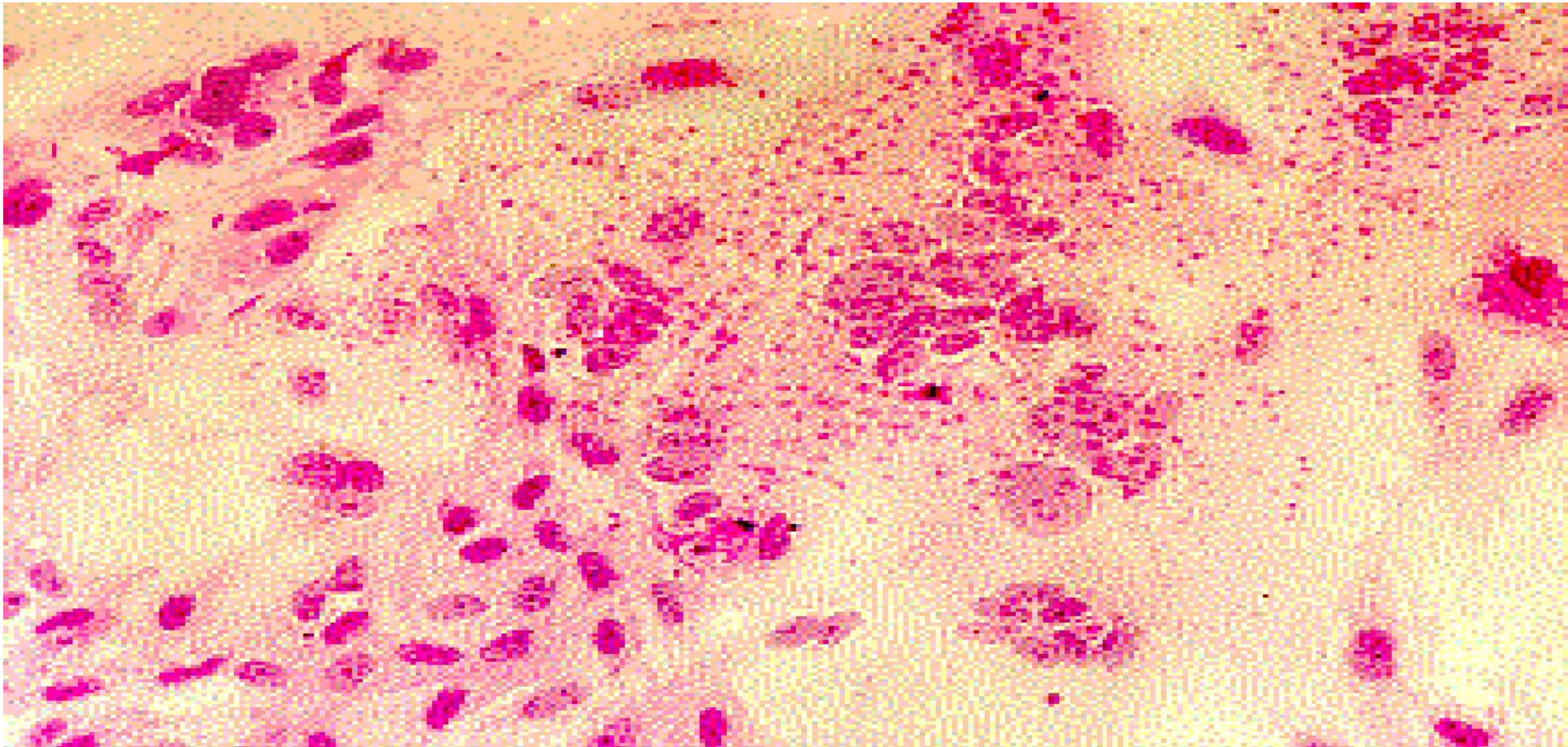
- основана на способности некоторых вирусов вызывать агглютинацию (склеивание) эритроцитов за счет вирусных гликопротеиновых шипов – **гемагглютининов**.





# Реакция гемадсорбции

**=РГАдс** = способность культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты.





# Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

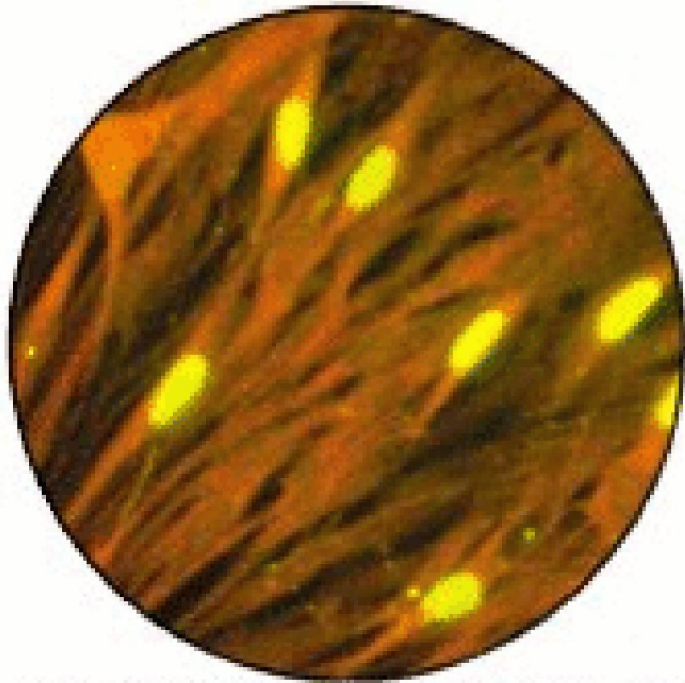


Fig. 2, CMV centrifugation culture fixed and stained 16 hrs after inoculation showing viral proteins in nuclei of infected human fibroblast cells

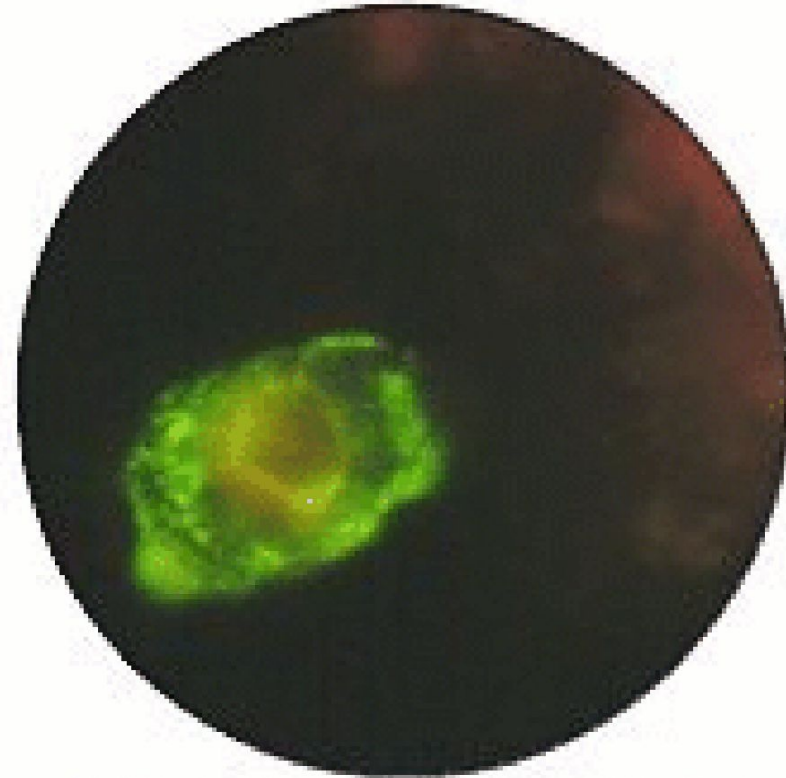


Fig. 3, HSV-infected epithelial cell from skin lesion (DFA)

## 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.