

Тема: Морфология и физиология вирусов

Особенности вирусов

1. Вирусы — мельчайшие микроорганизмы, не имеющие клеточного строения и белоксинтезирующей системы.
2. Вирусы содержат только ДНК или РНК.
3. Относятся к царству *Vira*.
4. Являются облигатными внутриклеточными паразитами, размножаются в цитоплазме или ядре клетки.
5. Вирусы отличаются особым (разобщенным) способом размножения: в клетке отдельно синтезируются нуклеиновые кислоты вирусов, отдельно - их белки, затем происходит их сборка в вирусные частицы. Сформированная вирусная частица называется вирионом.

Форма вирионов может быть различной: палочковидной (вирус табачной мозаики), пулевидной (вирус бешенства), сферической (вирусы полиомиелита, ВИЧ), в виде сперматозоида (многие бактериофаги). Различают просто устроенные и сложно устроенные вирусы.

Принципы классификации вирусов

- (1) Тип нуклеиновой кислоты, ее структура, стратегия репликации
- (2) Размеры, морфология, симметрия вириона, число капсомеров, наличие суперкапсида.
- (3) Наличие специфических ферментов, особенно РНК- и ДНК-полимеразы, нейраминидазы
- (4) Чувствительность к физическим и химическим агентам, особенно к эфиру
- (5) Иммунологические свойства
- (6) Естественные механизмы передачи
- (7) Тропизм к хозяину, тканям и клеткам
- (8) Патология, формирование включений
- (9) Симптоматология заболеваний.

Классификация вирусов (РНК-содержащие)

Семейство вирусов	Наличие суперкапсида	Тип симметрии	Структура РНК	Вирусы, патогенные для человека
Picornaviridae	Нет	Кубический	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “плюс”	Полиовирус, риновирус, вирус гепатита А
Caliciviridae	Нет	Кубический	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “плюс”	Вирус Норволк (норовирус), вирус гепатита Е
Reoviridae	Нет	Кубический	Двухнитчатая, 10 сегментов	Реовирус, ротавирус
Flaviviridae	Да	Кубический	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “плюс”	Вирусы клещевого энцефалита, японского энцефалита, желтой лихорадки, лихорадки Западного Нила, гепатита С
Togavirus	Да	Кубический	Однонитчатая, линейная, 2 сегментная, “плюс”	Вирус краснухи



Классификация вирусов (РНК-содержащие)

Семейство вирусов	Наличие суперкапсида	Тип симметрии	Структура РНК	Вирусы, патогенные для человека
Retroviridae	Да	Кубический	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “плюс”	ВИЧ, вирус Т-клеточной лейкемии человека
Orthomyxoviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, 8 сегментов, “минус”	Вирусы гриппа
Paramyxoviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “минус”	Вирусы парагриппа, кори, паротита, респираторно-синцитиальный вирус
Rhabdoviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “минус”	Вирус бешенства

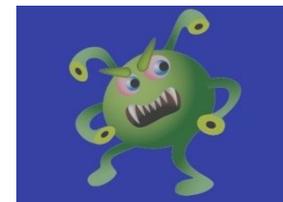
Классификация вирусов (РНК-содержащие)

Семейство вирусов	Наличие супер-капсида	Тип симметрии	Структура РНК	Вирусы, патогенные для человека
Filoviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “минус”	Вирус Эбола, вирус Марбург
Coronaviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “плюс”	Коронавирусы
Arenaviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая циркулярная, 2 сегмента, “минус”	Вирус лимфоцитарного хориоменингита
Bunyavirus	Да	Спиральный	Однонитчатая циркулярная, 3 сегмента, “минус”	Хантавирусы, вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, вирус геморрагической лихорадки с почечным синдромом



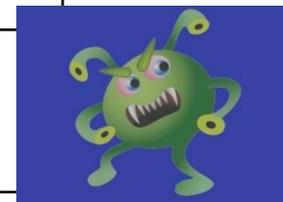
Классификация вирусов (РНК-содержащие)

Семейство вирусов	Наличие суперкапсида	Тип симметрии	Структура РНК	Вирусы, патогенные для человека
Bornaviridae	Да	Кубический	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “минус”	Вирусы болезни Борна
Astroviridae	Нет	Кубический	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “плюс”	Астровирусы человека
Deltavirus (не классифицированный вирус)	Да	неизвестный	Однонитчатая, циркулярная, кольцо, “минус”	Вирус гепатита Дельта



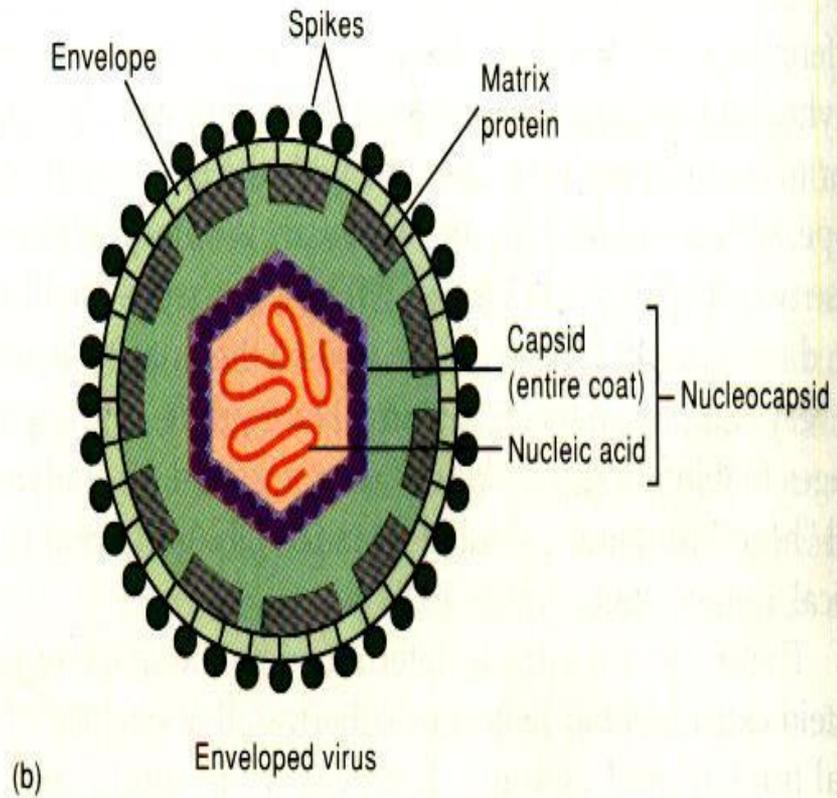
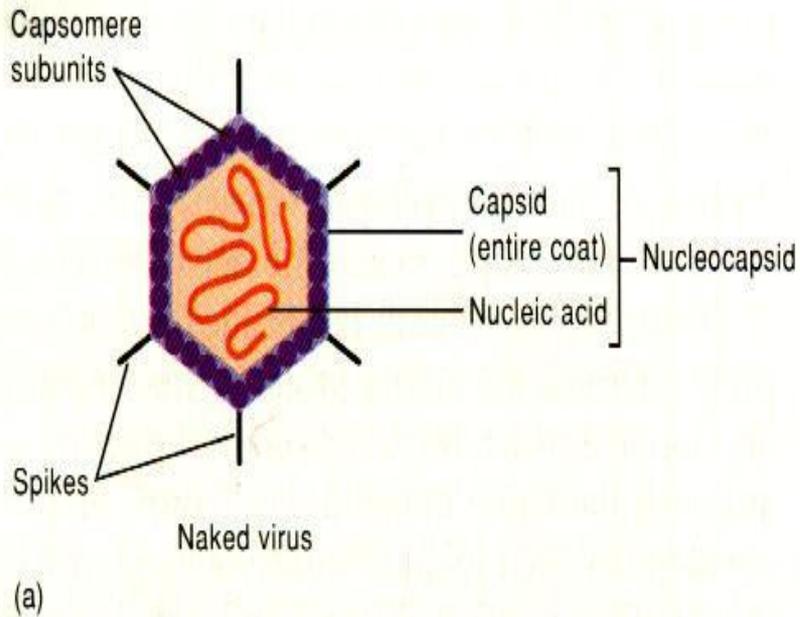
Классификация вирусов (ДНК-содержащие)

Семейство вирусов	Наличие суперкапсида	Тип симметрии	Структура ДНК	Вирусы патогенные для человека
Papovaviridae	Нет	Кубический	Двухнитчатая, циркулярная	Вирус папилломы
Adenoviridae	Нет	Кубический	Двухнитчатая, линейная	Аденовирус
Hepadnavirus	Да	Кубический	Двухнитчатая, дефектная, циркулярная	Вирус гепатита В
Herpesviridae	Да	Кубический	Двухнитчатая, линейная	Вирус простого герпеса 1, 2, опоясывающего герпеса-ветрянки, цитомегаловирус, Эпштейна-Барр вирус
Poxviridae	Да	Смешанный	Двухнитчатая, линейная	Вирус натуральной оспы
Parvoviridae	Нет	Кубический	Однонитчатая, линейная	Вирусы гастроэнтерита, инфекционной эритемы, гемолитической болезни



Строение простых и сложных вирусов

- **Простые, или безоболочечные, вирусы** состоят из нуклеиновой кислоты и белковой оболочки, называемой капсидом.
- **Сложные, или оболочечные, вирусы** снаружи капсида окружены липопротеиновой оболочкой (суперкапсидом). Эта оболочка является производной структурой от мембран вирус-инфицированной клетки.



A – простой вирус

B – сложный вирус

Типы взаимодействия вируса с клеткой.

Стадии репродукции вирусов.

- **Типы взаимодействия вируса с клеткой.** Различают три типа взаимодействия вируса с клеткой: продуктивный, abortивный и интегративный.
- Продуктивный тип — завершается образованием нового поколения вирионов и гибелью (лизисом) зараженных клеток (цитолитическая форма). Некоторые вирусы выходят из клеток, не разрушая их (нецитолитическая форма).
- Abortивный тип — не завершается образованием новых вирионов, поскольку инфекционный процесс в клетке прерывается на одном из этапов.
- Интегративный тип, или вирогения — характеризуется встраиванием (интеграцией) вирусной ДНК в виде провируса в хромосому клетки и их совместным сосуществованием (совместная репликация)

Репродукция вирусов осуществляется в несколько стадий:

1. адсорбция вируса на клетке;
2. проникновение вируса в клетку;
3. «раздевание» вируса;
4. биосинтез вирусных компонентов в клетке;
5. формирование вирусов;
6. выход вирусов из клетки.

- **Адсорбция.** Взаимодействие вируса с клеткой начинается с процесса адсорбции, т. е. прикрепления вирусов к поверхности клетки. Это высокоспецифический процесс. Вирус адсорбируется на определенных участках клеточной мембраны — так называемых рецепторах. Клеточные рецепторы могут иметь разную химическую природу, представляя собой белки, углеводные компоненты белков и липидов, липиды. Число специфических рецепторов на поверхности одной клетки колеблется от 10^4 до 10^5 . Следовательно, на клетке могут адсорбироваться десятки и даже сотни вирусных частиц.
- **Проникновение в клетку.** Существует два способа проникновения вирусов животных в клетку: виропексис и слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной. При виропексисе после адсорбции вирусов происходят инвагинация (впячивание) участка клеточной мембраны и образование внутриклеточной вакуоли, которая содержит вирусную частицу. Вакуоль с вирусом может транспортироваться в любом направлении в разные участки цитоплазмы или ядро клетки. Процесс слияния осуществляется одним из поверхностных вирусных белков капсидной или суперкапсидной оболочки. По-видимому, оба механизма проникновения вируса в клетку не исключают, а дополняют друг друга.
- **«Раздевание».** Процесс «раздевания» заключается в удалении защитных вирусных оболочек и освобождении внутреннего компонента вируса, способного вызвать инфекционный процесс. «Раздевание» вирусов происходит постепенно, в несколько этапов, в определенных участках цитоплазмы или ядра клетки, для чего клетка использует набор специальных ферментов. В случае проникновения вируса путем слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной процесс проникновения вируса в клетку сочетается с первым этапом его «раздевания». Конечными продуктами «раздевания» являются сердцевина, нуклеокапсид или нуклеиновая кислота вируса.

- **Биосинтез компонентов вируса.** Проникшая в клетку вирусная нуклеиновая кислота несет генетическую информацию, которая успешно конкурирует с генетической информацией клетки. Она дезорганизует работу клеточных систем, подавляет собственный метаболизм клетки и заставляет ее синтезировать новые вирусные белки и нуклеиновые кислоты, идущие на построение вирусного потомства.
- Реализация генетической информации вируса осуществляется в соответствии с процессами транскрипции, трансляции и репликации.
- **Формирование (сборка) вирусов.** Синтезированные вирусные нуклеиновые кислоты и белки обладают способностью специфически «узнавать» друг друга и при достаточной их концентрации самопроизвольно соединяются в результате гидрофобных, солевых и водородных связей.
- **Выход вирусов из клетки.** Различают два основных типа выхода вирусного потомства из клетки. Первый тип — взрывной — характеризуется одновременным выходом большого количества вирусов. При этом клетка быстро погибает. Такой способ выхода характерен для вирусов, не имеющих суперкапсидной оболочки. Вторым типом — почкованием. Он присущ вирусам, имеющим суперкапсидную оболочку. На заключительном этапе сборки нуклеокапсиды сложных вирусов фиксируются на клеточной плазматической мембране, модифицированной вирусными белками, и постепенно выпячивают ее. В результате выпячивания образуется «почка», содержащая нуклеокапсид. Затем «почка» отделяется от клетки. Таким образом, внешняя оболочка этих вирусов формируется в процессе их выхода из клетки. При таком механизме клетка может длительное время продуцировать вирус, сохраняя в той или иной мере свои основные функции.

Методы культивирования вирусов.

Для культивирования вирусов используют:

- культуры клеток;
- куриные эмбрионы;
- чувствительных лабораторных ЖИВОТНЫХ.

Культуры клеток

- Культуры клеток готовят из тканей животных или человека. Культуры **подразделяют на первичные (неперевиваемые), полуперевиваемые и перевиваемые.**
- Приготовление первичной культуры клеток складывается из нескольких последовательных этапов: измельчения ткани, разъединения клеток путем трипсинизации, отмывания полученной однородной суспензии изолированных клеток от трипсина с последующим суспендированием клеток в питательной среде, обеспечивающей их рост, например в среде 199 с добавлением телячьей сыворотки крови.
- Перевиваемые культуры в отличие от первичных адаптированы к условиям, обеспечивающим им постоянное существование *in vitro*, и сохраняются на протяжении нескольких десятков пассажей. Перевиваемые однослойные культуры клеток готовят из злокачественных и нормальных линий клеток, обладающих способностью длительно размножаться *in vitro* в определенных условиях. К ним относятся злокачественные клетки HeLa, первоначально выделенные из карциномы шейки матки, Нер-3 (из лимфоидной карциномы), а также нормальные клетки амниона человека, почек обезьяны и др.
- К полуперевиваемым культурам относятся диплоидные клетки человека. Они представляют собой клеточную систему, сохраняющую в процессе 50 пассажей (до года) диплоидный набор хромосом, типичный для соматических клеток используемой ткани. Диплоидные клетки человека не претерпевают злокачественного перерождения и этим выгодно отличаются от опухолевых.

ЦПД (цитопатическое действие) - любые изменения клеток в культуре клеток под влиянием размножающегося в них вируса. Морфологические изменения в клетке можно обнаружить микроскопированием при малом увеличении (объектив x 8-10, окуляр x 7-10) слоя клеток в пробирке. При этом сравнивают зараженные культуры клеток с контрольными. Любые наблюдаемые отличия можно считать проявлением ЦПД.

Цитопатическое действие

1. *Полная дегенерация* клеточного монослоя. Отдельные клетки, которые остаются живыми, изменяют свою морфологию, у них заметный пикноз ядра и цитоплазмы. (пикорнавирусы - вирусы полиомиелита Коксаки, ЕСНО).

2. *Симпластообразующий* тип ЦПД (возбудители кори, эпидемического паротита, парагриппа, респираторно-синцитиальных вирусов). Возникают многоядерные гигантские клетки (симпласты или синцитий).

3. *Круглоклеточная* дегенерация (аденовирусы).

При репродукции риновирусов образуются округлые клетки, которые имеют отростки, а при размножении герпесвирусов наблюдается формирование подобных клеток одинакового размера, которые разбросаны по всему монослою.

4. *Пролиферативный* тип изменений (онкогенные вирусы) - формирование нескольких слоев клеток.

FireAiD - все по
медицине.

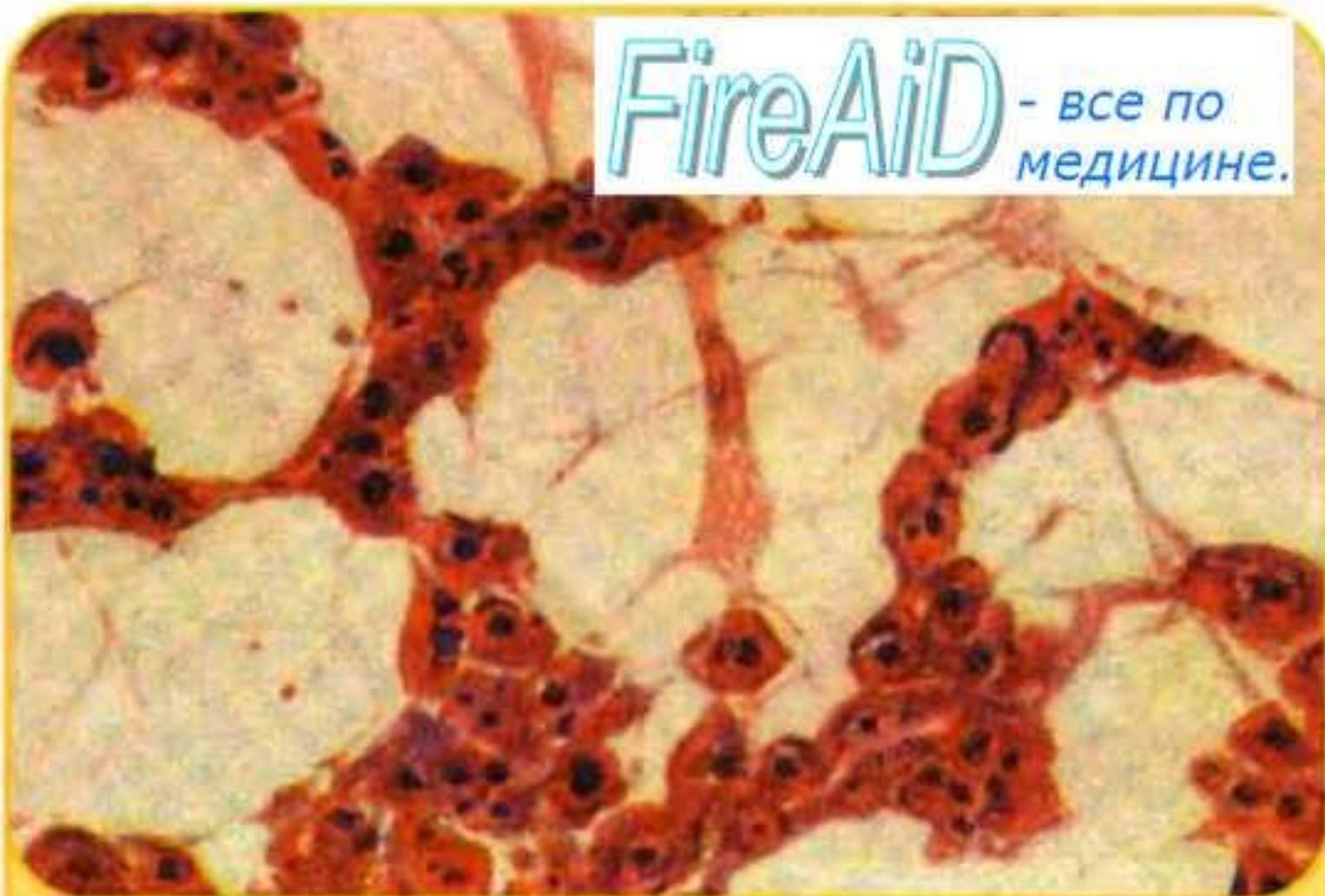
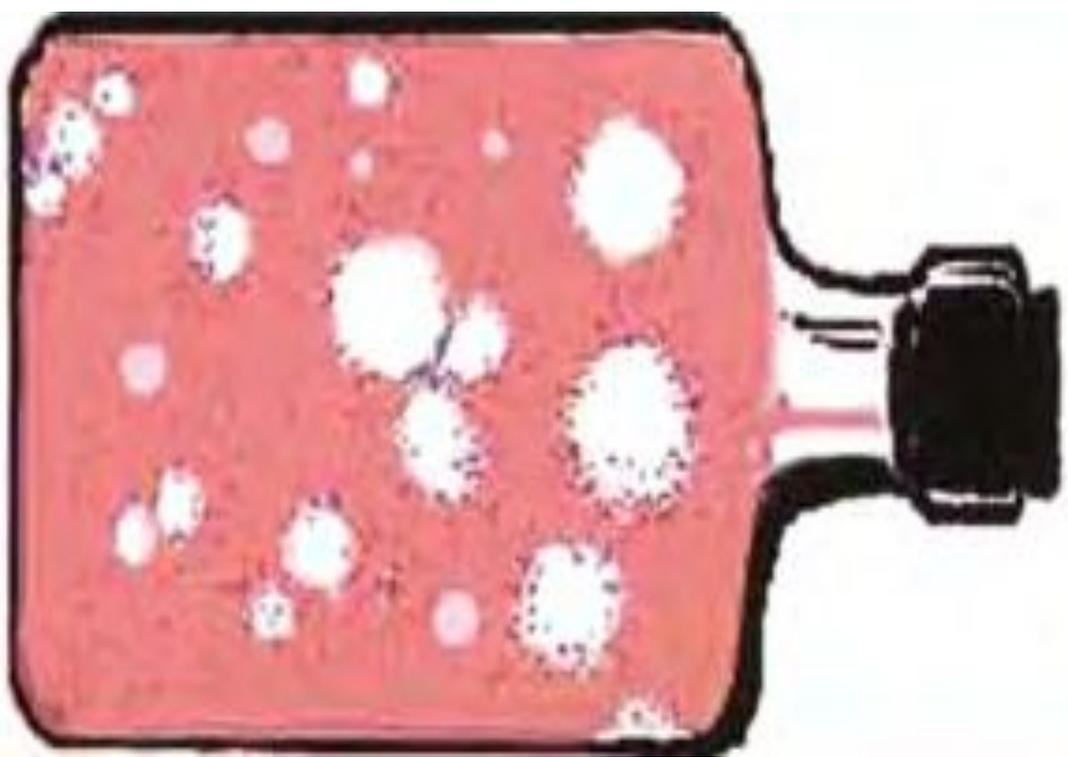
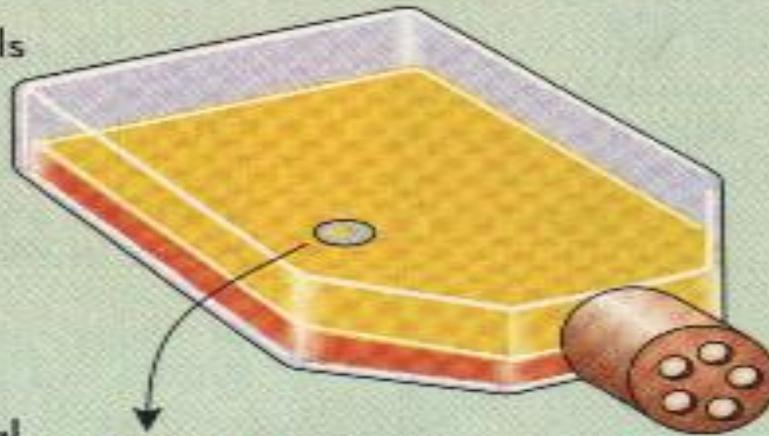


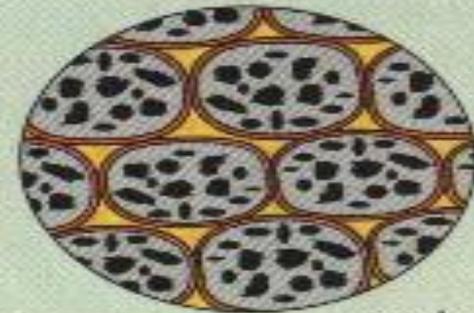
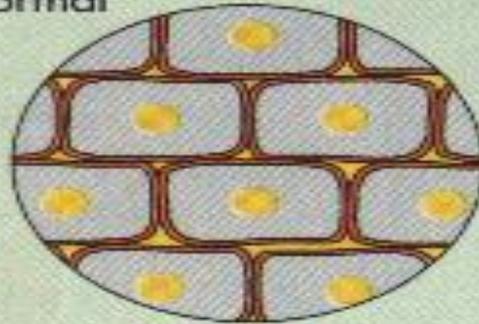
Рис. 4.12. ЦПД вируса



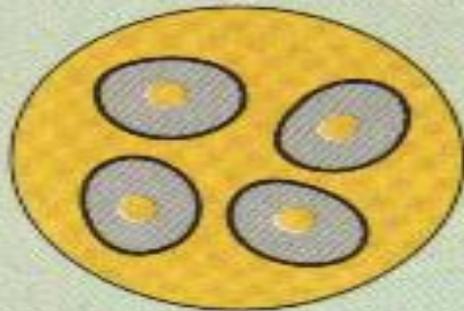
Virus-infected cells



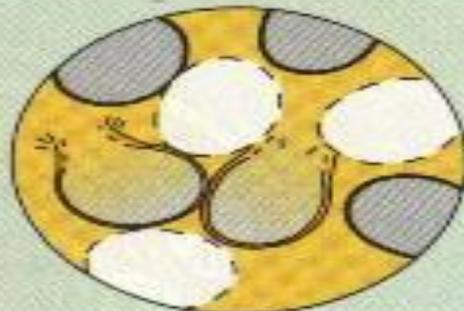
Normal



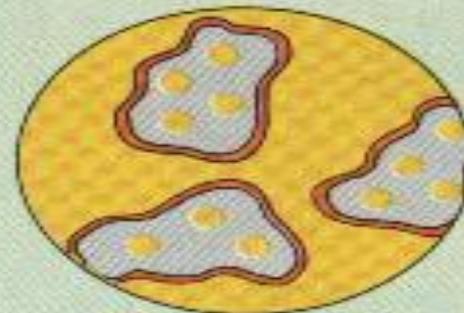
Inclusion body formation



Cell rounding, detachment



Cell lysis



Fused cells



Индикацию вирусов проводят на основе следующих феноменов:

- цитопатического действия (ЦПД) вирусов,
- образования внутриклеточных включений,
- образования бляшек,
- реакции гемагглютинации,
- реакции гемадсорбции,
- «цветной» реакции.

Методы определения вида и типа вирусов

- Реакция нейтрализации (РН)
- Реакция гемагглютинации (РГА)
- Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)
- Метод иммунофлюоресценции
- Биологические модели для индикации и идентификации вирусов

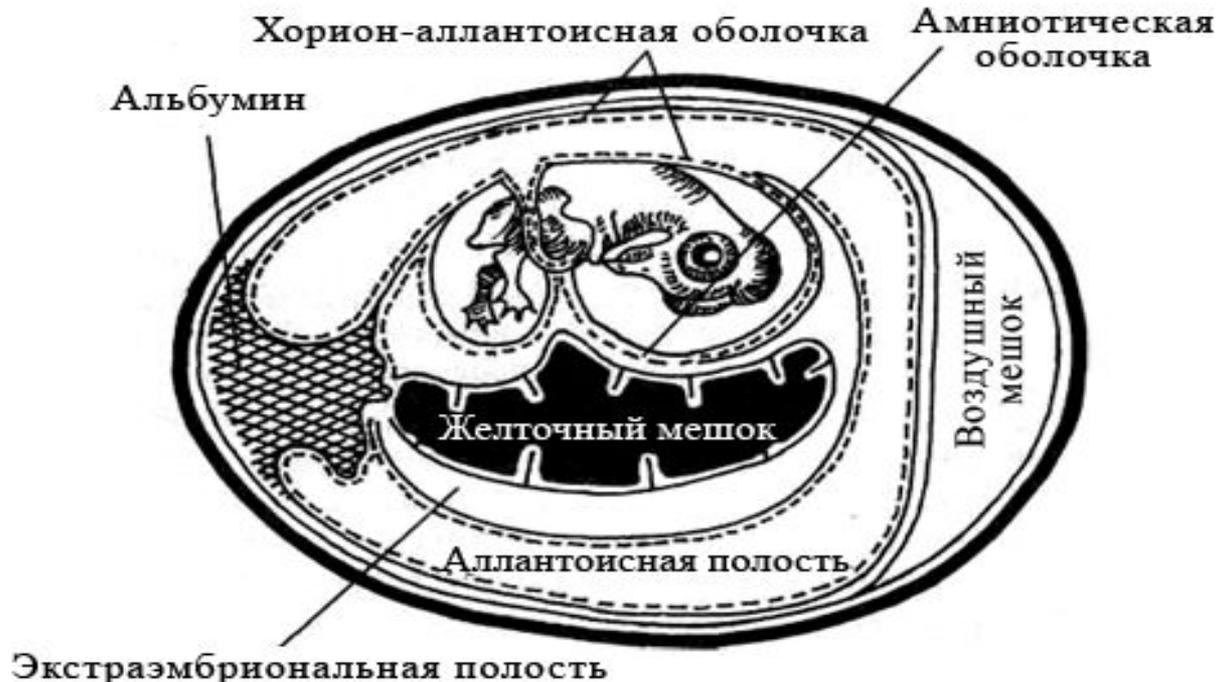
Диагностические препараты, применяемые для идентификации выделенных вирусных культур

- Специфические иммунные диагностические сыворотки
- Специфические иммунные диагностические сыворотки, обработанные флюорохромом

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах .

Большинство известных вирусов обладают способностью размножаться в курином эмбрионе. Используют эмбрионы в возрасте от 8 до 14 дней в зависимости от вида вируса, способа заражения и задач исследования. Вирусы гриппа культивируются в 9-10, осповакцины - в 12, паротита - в 7-дневных куриных эмбрионах.

Куриные эмбрионы заражают вирусосодержащим материалом в асептических условиях стерильными инструментами, предварительно обработав скорлупу над воздушным пространством йодом и спиртом. Заражение проводят на **хорион-аллантаисную оболочку**, в **амниотическую** и



Культивирование вирусов в организме лабораторных животных

Видовая чувствительность животных к определенному вирусу и их возраст определяют репродуктивную способность вирусов. Во многих случаях только новорожденные животные чувствительны к тому или иному вирусу (например, мышисосунки — к вирусам Коксаки).

Преимущество данного метода перед другими состоит в возможности выделения тех вирусов, которые плохо репродуцируются в культуре или эмбрионе. К его недостаткам относятся контаминация организма подопытных животных посторонними вирусами и микоплазмами, а также необходимость последующего заражения культуры клеток для получения чистой линии данного вируса, что удлиняет сроки исследования.

Питательные среды, которые используются для поддержки культур клеток или их роста

Бывают естественными или синтетическими (искусственными).

Естественные среды - сыворотка крови крупного рогатого скота, жидкости из серозных полостей, продукты гидролиза молока, многообразные гидролизаты (5 % гемогидролизат, 0,5 % гидролизат лактоальбумина) или экстракты тканей. Их химический состав помогает создать условия, какие подобные к тем, что существуют в организме человека. Существенным недостатком таких сред считается их нестандартность, ведь качественный и количественный состав компонентов, которые входят к их составу, может изменяться.

Синтетические питательные среды не имеют этого недостатка, их химический состав стандартен, потому что их получают, комбинируя многообразные солевые растворы (витамины, аминокислоты) в искусственных условиях. К таким наиболее употребимым растворам принадлежат среда 199 (культивирование первично-трипсинизированных и перевиваемых культур клеток), среда Игла (содержит минимальный набор аминокислот и витаминов и используется для культивирования диплоидных линий клеток и перевиваемых), среда Игла MEM (культивирование особенно требовательных линий клеток), раствор Хенкса, что используется для изготовления питательных сред, отмывания клеток и тому подобное.