

ВИРУСЫ-ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Структура и биология вирусов. Методы
микробиологической диагностики вирусных инфекций

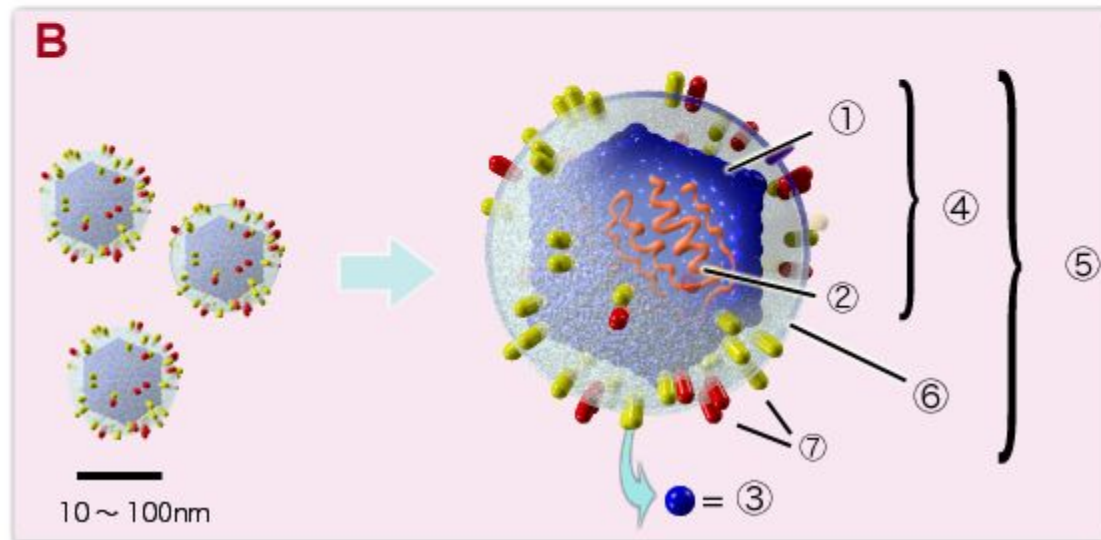
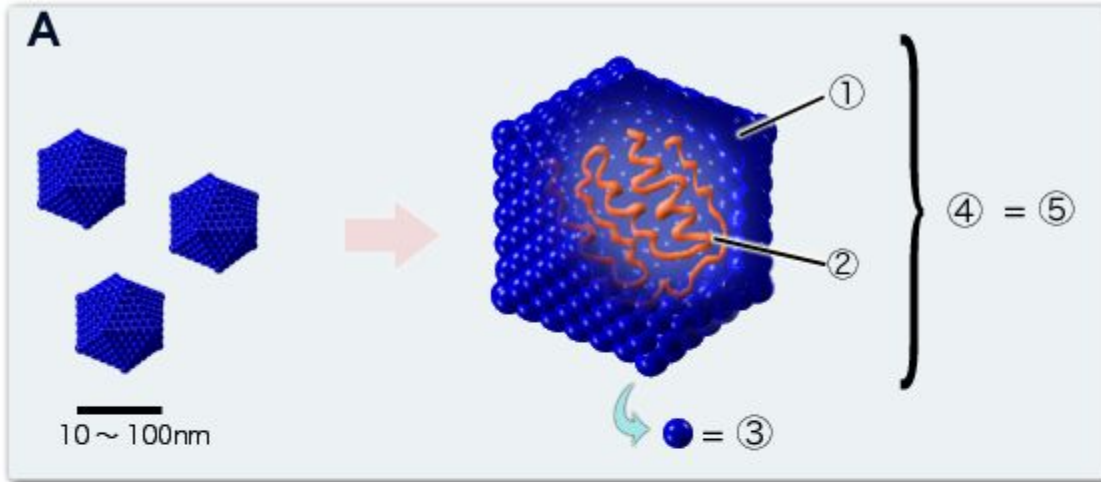
ВИРУСЫ

- автономные генетические ультрамикроскопических размеров микроорганизмы, обладающие одним типом нуклеиновых кислот, лишенные собственной системой синтеза белка и мобилизации энергии, способные размножаться внутри живых клеток.
- **Основные свойства вирусов:**
 - размножение;
 - наследуемость;
 - изменчивость признаков;
 - адаптируемость к условиям внешней среды.

СТРУКТУРА И БИОЛОГИЯ ВИРУСОВ

- Вирусные частицы (вирионы) Вирусные частицы (вирионы) представляют собой белковую капсулу — капсид Вирусные частицы (вирионы) представляют собой белковую капсулу — капсид, содержащую геном вируса, представленный одной или несколькими молекулами ДНК Вирусные частицы (вирионы) представляют собой белковую капсулу — капсид, содержащую геном вируса, представленный одной или несколькими молекулами ДНК или РНК. Капсид построен из **капсомеров** — белковых комплексов, состоящих в свою очередь из **протомеров**. Нуклеиновая кислота в комплексе с белками обозначается термином **нуклеокапсид**. Некоторые вирусы имеют также внешнюю липидную оболочку. Размеры различных вирусов колеблются от 20 (пикорнавирусы). Некоторые вирусы имеют также внешнюю липидную оболочку. Размеры различных вирусов колеблются от 20 (пикорнавирусы) до 500 (мимивирусы). Некоторые вирусы имеют также внешнюю липидную оболочку. Размеры различных вирусов колеблются от 20 (пикорнавирусы) до 500 (мимивирусы) и более нанометров. Некоторые вирусы имеют также внешнюю липидную оболочку. Размеры различных

СТРУКТУРА И БИОЛОГИЯ ВИРУСОВ



Примеры структур
икосаэдрических
вирионов.

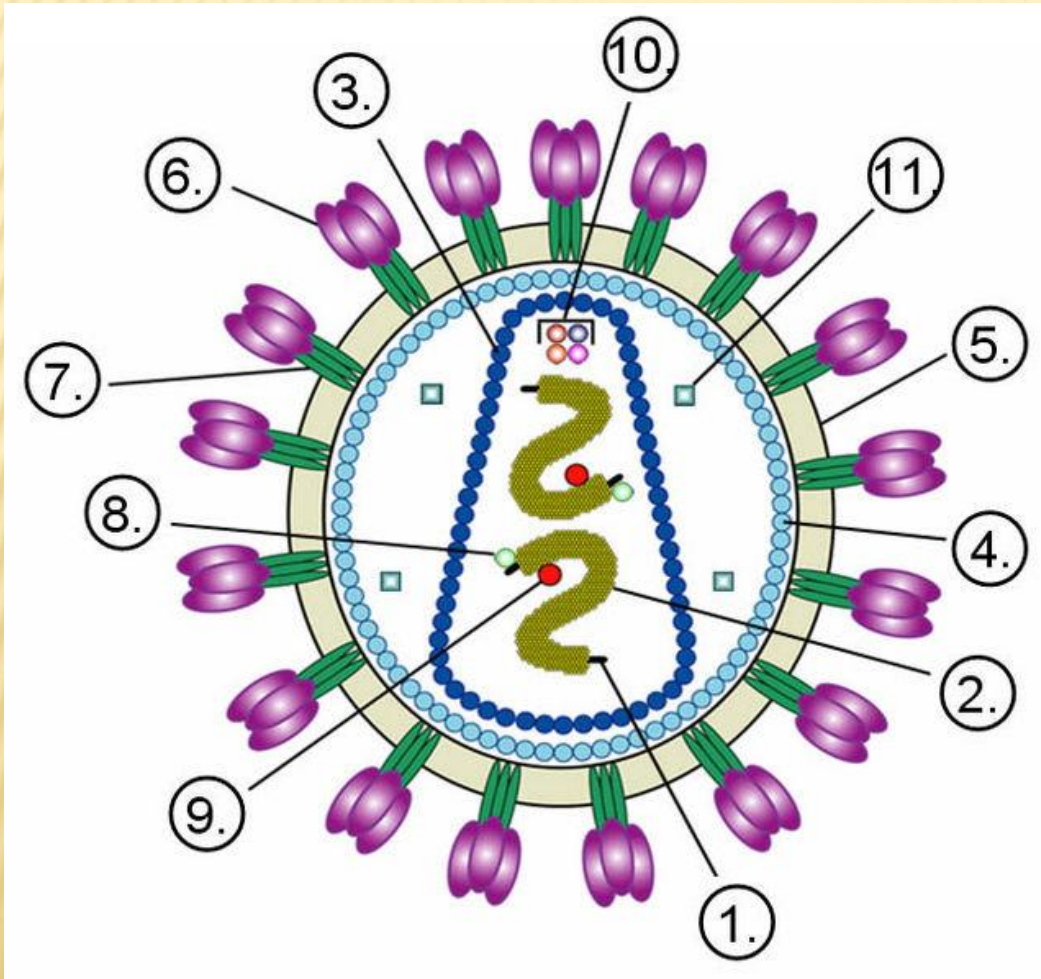
A. Вирус, не имеющий
липидной оболочки
(например,
пикорнавирус).

B. Оболочечный вирус
(например,
герпесвирус).

**Цифрами
обозначены:**

- (1) капсид,
- (2) геномная
нуклеиновая кислота,
- (3) капсомер,
- (4) нуклеокапсид,
- (5) вирион,
- (6) липидная
оболочка,
- (7) мембранные белки

СТРУКТУРА И БИОЛОГИЯ ВИРУСОВ



Структура вириона неикосаэдрического оболочечного вируса на примере **ВИЧ**.

Цифрами обозначены: (1) РНК-геном вируса, (2) нуклеокапсид, (3) капсид, (4) белковый матрикс, подстилающий (5) липидную мембрану, (6) gp120 — гликопротеин, с помощью которого происходит связывание вируса с клеточной мембраной, (7) gp41 — трансмембранный гликопротеин.

Цифрами 8—11 обозначены белки, входящие в состав вириона и необходимые вирусу на ранних стадиях инфекции: (8) — интеграза, (9) — обратная

СТРУКТУРА И БИОЛОГИЯ ВИРУСОВ

Классификация Балтимора

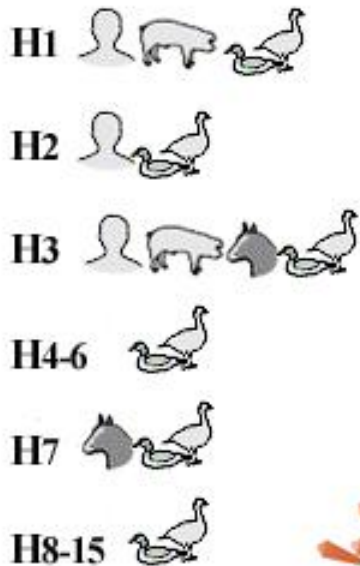
Нобелевский лауреат, биолог Дэвид Балтимор Нобелевский лауреат, биолог Дэвид Балтимор, предложил свою схему классификации вирусов, основываясь на различиях в механизме продукции мРНК. Эта система включает в себя семь основных групп: ^{[8][9]}

- I. Вирусы, содержащие двуцепочечную ДНК и не имеющие РНК-стадии (например, герпесвирусы I. Вирусы, содержащие двуцепочечную ДНК и не имеющие РНК-стадии (например, герпесвирусы, поксвирусы I. Вирусы, содержащие двуцепочечную ДНК и не имеющие РНК-стадии (например, герпесвирусы, поксвирусы, паповавирусы I. Вирусы, содержащие двуцепочечную ДНК и не имеющие РНК-стадии (например, герпесвирусы, поксвирусы, паповавирусы, мимивирус).
- II. Вирусы, содержащие двуцепочечную РНК (например, ротавирусы).
- III. Вирусы, содержащие одноцепочечную молекулу ДНК (например, парвовирусы III. Вирусы, содержащие одноцепочечную молекулу ДНК (например, парвовирусы). (IV) Вирусы, содержащие одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности (например, пикорнавирусы III. Вирусы, содержащие одноцепочечную молекулу ДНК (например, парвовирусы). (IV) Вирусы, содержащие одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности (например, пикорнавирусы, флавивирусы).
- V. Вирусы, содержащие одноцепочечную молекулу РНК негативной или двойной полярности (например, ортомиксовирусы V. Вирусы, содержащие одноцепочечную молекулу РНК негативной или двойной полярности

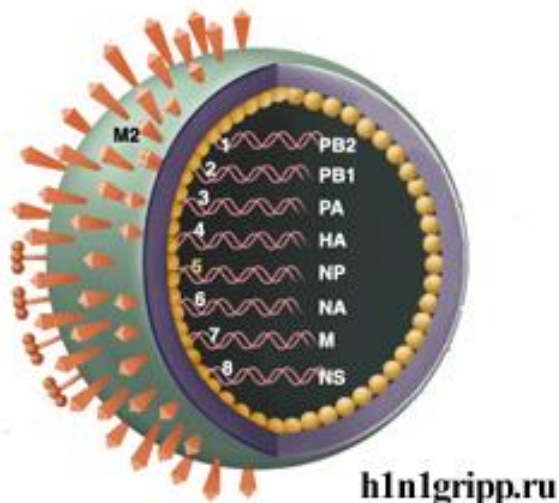
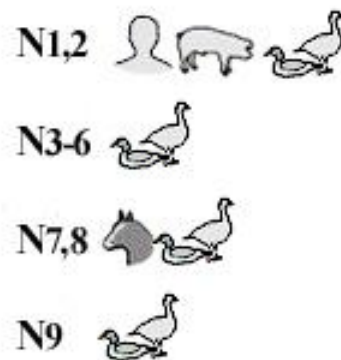
СТРУКТУРА И БИОЛОГИЯ ВИРУСОВ

Структура вируса свиного гриппа A/H1N1

Гемагглютинин



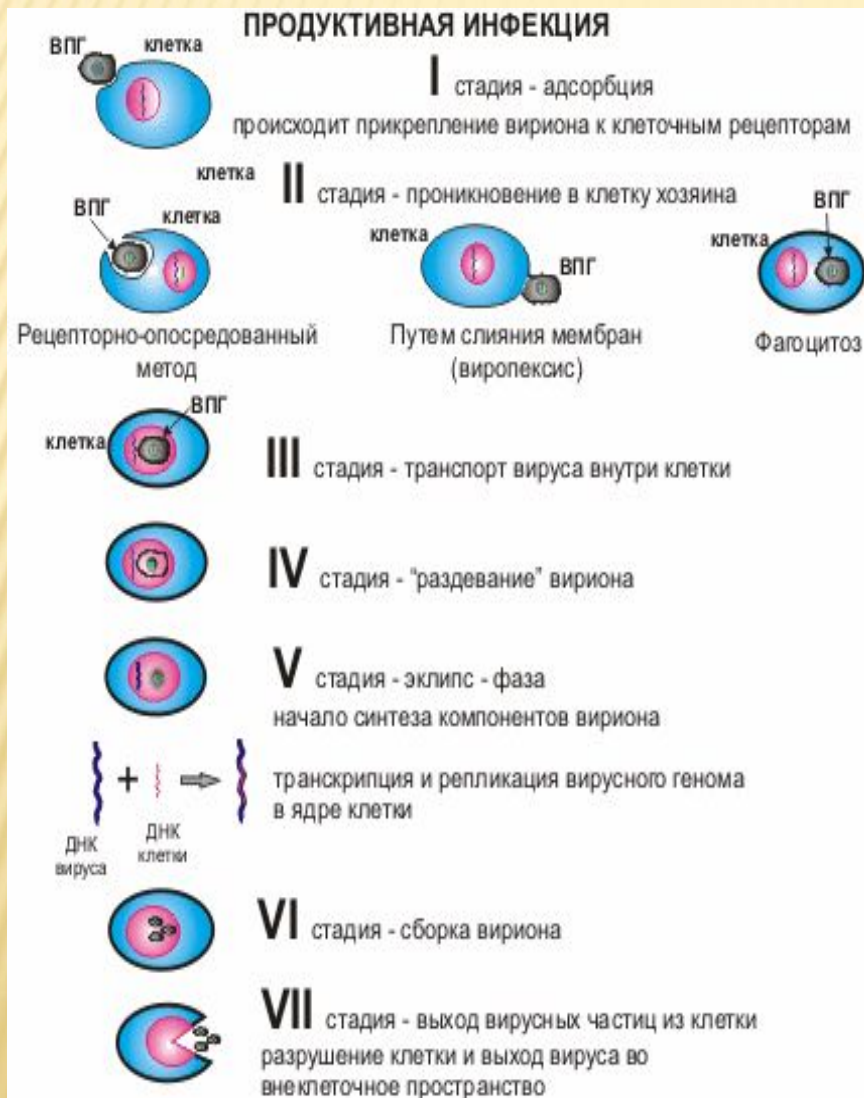
Нейраминидаза



Вирионы вирусов гриппа А имеют диаметр 120 нм и строение, типичное для семейства ортомиксовирусов (*Orthomyxoviridae*). Гемагглютинины суперкапсида являются основными поверхностными антигенами и могут быть представлены только одним из 16 типов гемагглютининов. Вирусы гриппа человека могут содержать гемагглютинины H1, H2 или H3, тогда как вирусы гриппа птиц и животных – от H1 до H16. Нейраминидаза на поверхности суперкапсида содержится в меньшем количестве, чем гемагглютинин, и так же может быть представлена одним из 9 известных типов. Вирусы гриппа животных и птиц содержат один тип нейраминидазы от N1 до N9, вирусы гриппа человека имеют только N1

СТРУКТУРА И БИОЛОГИЯ ВИРУСОВ

МЕХАНИЗМ ИНФИЦИРОВАНИЯ



1. Присоединение к клеточной мембране
2. Проникновение в клетку
3. Перепрограммирование клетки
4. Персистенция
5. Создание новых вирусных компонентов
6. Созревание вирионов и выход из клетки.

СТРУКТУРА И БИОЛОГИЯ ВИРУСОВ

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В лабораторной диагностике вирусных инфекций имеются три основных подхода:

- 1) непосредственное исследование материала на наличие вирусного антигена или нуклеиновых кислот;
- 2) изоляция и идентификация вируса из клинического материала;
- 3) серологическая диагностика, основанная на установлении значительного прироста вирусных антител в течение болезни.

Прямые методы диагностики клинического материала

Прямые методы – это методы, которые позволяют обнаружить вирус, вирусный антиген или вирусную *нуклеиновую кислоту* (НК) непосредственно в клиническом материале, то есть являются наиболее быстрыми (2–24 ч). Однако из-за ряда особенностей возбудителей прямые методы имеют свои ограничения (возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов). Поэтому они часто требуют подтверждения непрямыми методами.

Непрямые методы диагностики

Выделение вирусов – один из самых старых и трудоемких методов диагностики. Однако и сегодня выделение вируса с последующей идентификацией с помощью одного из современных методов (ИФА с моноклональными антителами или ПЦР) является наиболее достоверным методом диагностики – так называемый "золотой стандарт"

- При любом выбранном подходе к вирусной диагностике одним из важнейших факторов является качество исследуемого материала. Так, например, для прямого анализа образца или для изоляции вируса исследуемый материал должен быть получен в самом начале заболевания, когда возбудитель еще экскретируется в относительно больших количествах и не связан пока антителами, а объем образца должен быть достаточен для проведения прямого исследования. Также важен выбор материала в соответствии с предполагаемым заболеванием, то есть того материала, в котором исходя из патогенеза инфекции вероятность присутствия вируса наибольшая.
- Не последнюю роль в успешной диагностике играет среда, в какую берется материал, как он транспортируется и как хранится. Так, носоглоточные или ректальные мазки, содержащее везикул помещают в среду, содержащую белок, предотвращающий быструю потерю инфекционности вируса (если планируется его изоляция), или в соответствующий буфер (если планируется работа с нуклеиновыми кислотами).

СТРУКТУРА И БИОЛОГИЯ ВИРУСОВ

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Методы	Время	Преимущества	Недостатки
Культура клеток	Дни - недели	Высокая специфичность и чувствительность; возможность дальнейшей работы с выделенным вирусом	Необходимость в специальном оборудовании, длительность
Прямые методы диагностики	Часы - 1 день	Быстрота; применимость для вирусов, которые сложно культивировать	Риск получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов; сложность одновременного проведения большого количества исследований
Серологические	Недели	Определение иммунного ответа на вирус; применимость для вирусов, которые сложно культивировать	Возможность перекрестных реакций; во многих случаях необходимы парные сыворотки крови

ПРЯМЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Электронная микроскопия (ЭМ).

С помощью этого метода можно обнаружить собственно вирус. Для успешного определения вируса его концентрация в пробе должна быть примерно $1 \cdot 10^6$ частиц в 1 мл.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ). Метод основан на использовании антител, связанных с красителем, например флюоресцеинизотиоцианатом. РИФ широко применяется для выявления вирусных антигенов в материале больных и для быстрой диагностики.

Иммуноферментный анализ (ИФА).

Иммуноферментные методы определения вирусных антигенов в принципе сходны с РИФ, но основываются на мечении антител ферментами, а не красителями. Наиболее широко используется пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза, применяют также b-галактозидазу и b-лактамазы.

Радиоиммунный анализ (РИА).

Метод основан на метке антител радиоизотопами, что обеспечивало высокую чувствительность в определении вирусного антигена. Широкое распространение метод получил в 80-е годы, особенно для определения маркеров HBV и других некультивируемых вирусов. К недостаткам метода относится необходимость работать с радиоактивными веществами и использования дорогостоящего оборудования (гамма-счетчиков).

Молекулярные методы.

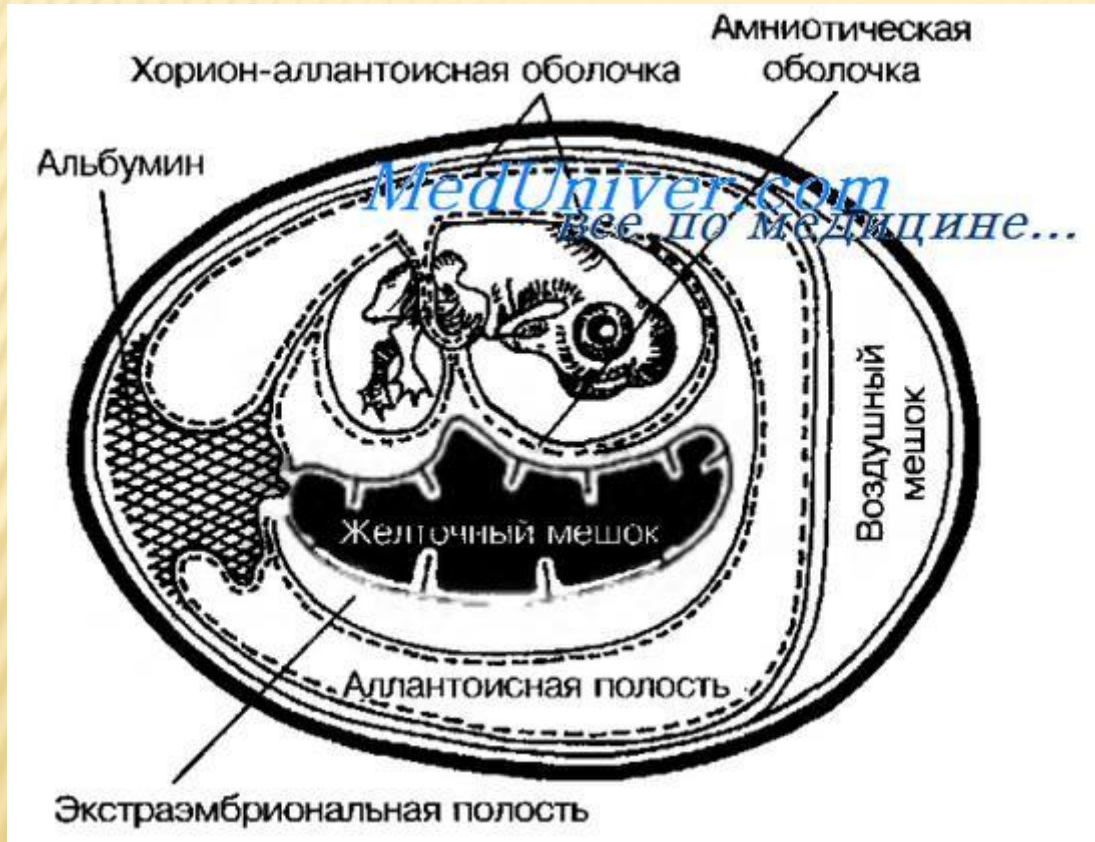
Первоначально классическим методом выявления вирусного генома считался высокоспецифичный метод гибридизации НК, но в настоящее время все шире используется выделение геномов вируса с помощью *полимеразной цепной реакции (ПЦР)*.

Цитологические методы в настоящее время имеют ограниченное диагностическое значение, но при ряде инфекций по-прежнему должны применяться. Исследуются материалы аутопсии, биопсии, мазки, которые после соответствующей обработки окрашиваются и анализируются под микроскопом. При цитомегаловирусной инфекции, например, в срезах ткани или в моче обнаруживаются характерные гигантские клетки – "совиный глаз", при бешенстве – включения в цитоплазме клеток (тельца Бабеша–Негри). В некоторых случаях, например при дифференциальной диагностике хронических гепатитов, имеет значение оценка состояния ткани печени.

НЕПРЯМЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

- Для успешного выделения вирусов клинический материал должен быть взят в соответствии с патогенезом предполагаемого заболевания и в наиболее ранние сроки.
- Как правило, берутся:
 - при респираторных инфекциях – носоглоточный смыв;
 - при энтеровирусных инфекциях – смыв и фекалии (рео-, энтеровирусы);
 - при поражениях кожи и слизистых оболочек – соскобы, содержимое пузырьков (герпес, ветряная оспа);
 - при экзантемных инфекциях – смывы (корь, краснуха);
 - при арбовирусных инфекциях – кровь, спинномозговая жидкость.
- **Для выделения вирусов используют культуры клеток, лабораторных животных, эмбрионы кур. Процесс длительный, иногда требующий проведения нескольких пассажей, прежде чем вирус будет обнаружен и идентифицирован с помощью одного или нескольких методов – в реакции нейтрализации (РН), РИФ, ИФА или ПЦР.**

КУРИНЫЕ ЭМБРИОНЫ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ



Куриные эмбрионы — практически идеальные модели для культивирования некоторых вирусов (например, гриппа и кори). Замкнутая полость эмбриона препятствует проникновению микроорганизмов извне, а также развитию спонтанных вирусных инфекций. Эмбрионы применяют для первичного выделения вирусов из патологического материала; для пассирования и сохранения их, а также для получения необходимых количеств вируса.

Заражение проводят на хорион-аллантаисную оболочку, в амниотическую или аллантаисную полость либо в желточный мешок.

НАБЛЮДЕНИЕ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ЗАРАЖЕНИЯ ВИРУСОМ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

В качестве вирусосодержащего материала можно использовать содержимое **желточного мешка**, аллантаисную и амниотическую жидкости либо весь эмбрион, нарезанный вместе с окружающими тканями на кусочки. Для выявления характерных поражений на хорион-аллантаисной мембране удаляют скорлупу и наружную оболочку. Затем мембрану извлекают и помещают в стерильную воду. Характер поражений изучают на тёмном фоне.

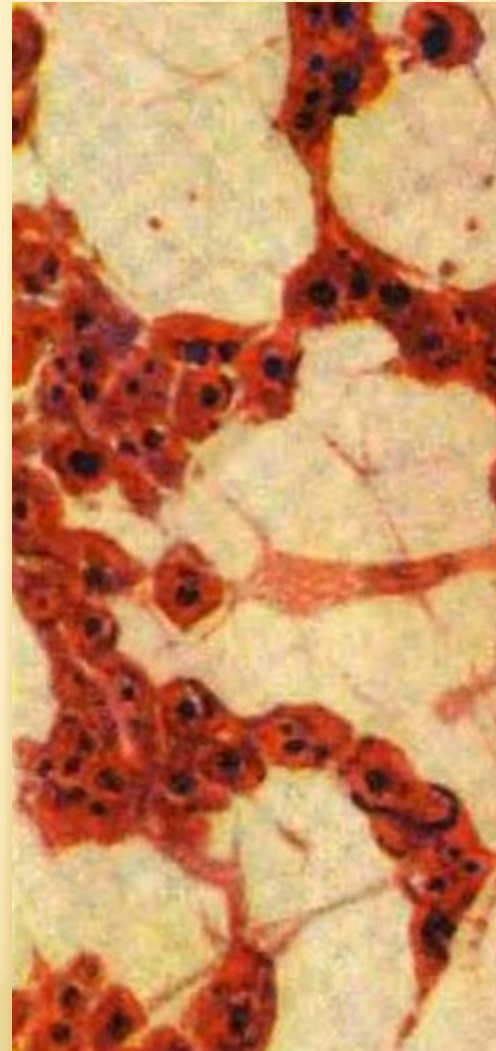
При невозможности выделить и идентифицировать вирус стандартными методами *in vitro* инфекционный материал вводят **чувствительным к возбудителю животным**, и после развития типичного инфекционного процесса проводят повторное заражение чувствительных клеточных культур. Наиболее часто используют мышей, кроликов и обезьян.

Вследствие дороговизны и сложности содержания лабораторных животных, практически повсеместно их вытеснили клеточные культуры. Тем не менее животные модели активно используют для изучения особенностей патогенеза и формирования иммунных реакций при вирусных инфекциях.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

Наличие и биологическую активность вирусов определяют по эффектам, наблюдаемым на животных моделях (повышение температуры тела, появление характерных клинических признаков, гибель и т.д.), куриных эмбрионах и на клетках (в культурах). Под воздействием конкретных вирусов возможно изменение морфологии, роста, репродукции клеток либо их разрушение.

Факт размножения вирусов в чувствительных клетках *in vitro* определяют по цитопатическим эффектам (в том числе бляшкообразованию, тельцам включений), феномену гемадсорбции, «цветной реакции».



Цитопатический эффект вирусов

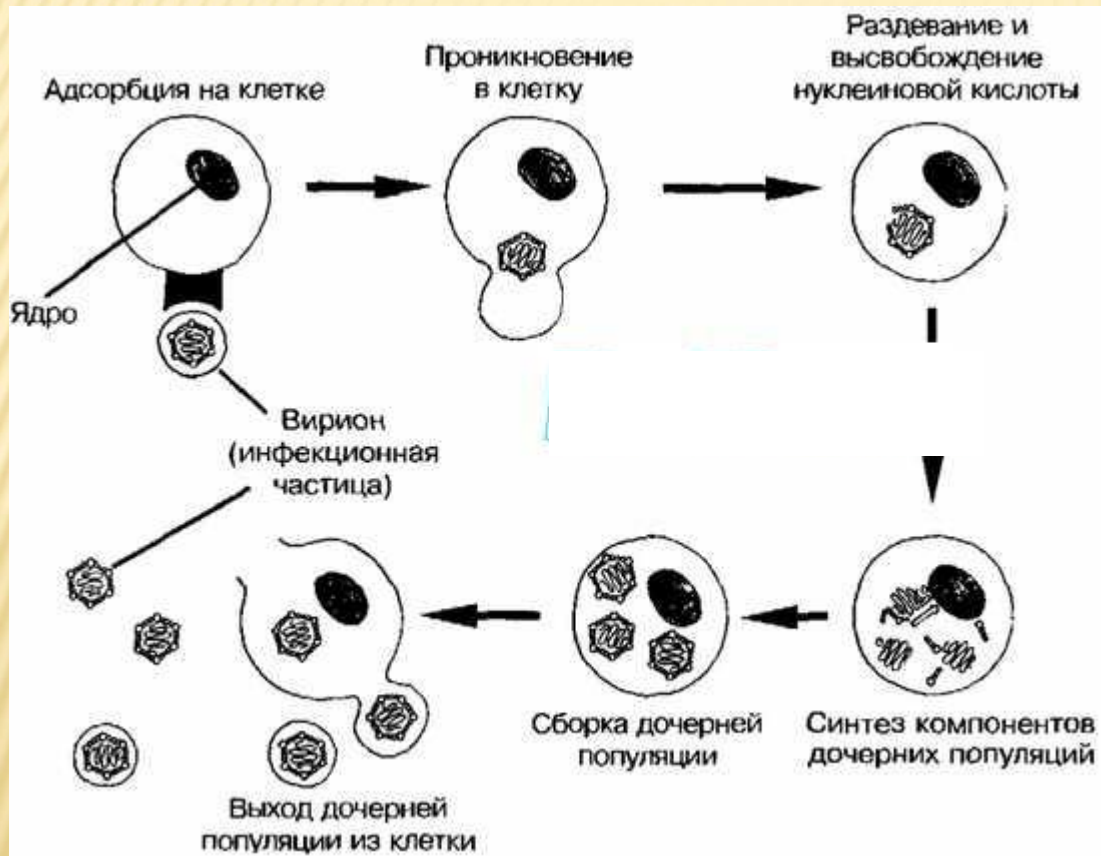
ЦИТОПАТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВИРУСОВ

- оценивают при микроскопии клеточных культур. По степени поражения клеток выделяют вирусы с высокой или умеренной цитопатогенностью. Размножение вирусов в культурах клеток сопровождается нарушениями морфологии клеток монослоя. Некоторые вирусы вызывают характерные цитопатические изменения, что (с учётом клинической картины заболевания) позволяет быстро поставить предварительный диагноз. Например, размножение парамиксовирусов (вирусы кори, паротита, РС-вирус) сопровождается появлением характерных гигантских многоядерных клеток; аденовирусы вызывают образование скоплений больших круглых клеток, а при репродукции герпесвирусов клетки округлой формы диффузно располагаются по всему монослою.

БЛЯШКООБРАЗОВАНИЕ ВИРУСОВ

«**Бляшками**» называют негативные колонии — участки разрушенных клеток, выглядящие как зоны просветления на монослоях клеток, покрытых слоем агара. В некоторых случаях дозу и цитопатогенность вируса выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ). Тельца включений. Многие вирусы вызывают появление в заражённых клетках характерных образований — скоплений вирусных белков или частиц, видимых в световой микроскоп. Тельца включений могут располагаться как в цитоплазме (тельца Гварнери при оспе), так и в ядрах клеток (аденовирусы).

ФЕНОМЕН ГЕМАДСОРБЦИИ ВИРУСОВ



Многие заражённые **вирусами клетки** приобретают способность сорбировать на своей поверхности различные эритроциты. Феномен гемадсорбции имеет общие механизмы с гемагглютинацией и проявляется на ранних сроках, до проявления цитопатического эффекта, при его отсутствии либо слабой выраженности.

ЦВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ

В культуральную среду, используемую для поддержания клеток, **вносят индикатор**. Рост клеток сопровождается накоплением метаболитов, сдвигом рН среды и изменением окраски индикатора. Заражение культур вирусом резко ингибирует клеточный метаболизм, и среда сохраняет первоначальный цвет.