Лекция № 5. Общая вирусология. Классификация, структура и особенности биологии вирусов. Бактериофаги.

Открытие вирусов Д.И.Ивановским в 1892г. положило начало развитию науки вирусологии. Более быстрому ее развитию способствовали: изобретение электронного микроскопа, разработка метода культивирования микроорганизмов в культурах клеток.

Слово “вирус” в переводе с латинского- яд (животного происхождения). Этот термин применяют для обозначения уникальных представителей живой природы, не имеющих клеточного (эукариотического или прокариотического) строения и обладающих облигатным внутриклеточным паразитизмом, т.е. которые не могут жить без клетки.

В настоящее время вирусология- бурно развивающаяся наука, что связано с рядом причин:

- ведущей ролью вирусов в инфекционной патологии человека (примеры- вирус гриппа, ВИЧ- вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус и другие герпесвирусы) на фоне практически полного отсутствия средств специфической химиотерапии;

- использованием вирусов для решения многих фундаментальных вопросов биологии и генетики.

Основные свойства вирусов (и плазмид), по которым они отличаются от остального живого мира.

1.Ультрамикроскопические размеры (измеряются в нанометрах). Крупные вирусы (вирус оспы) могут достигать размеров 300 нм, мелкие- от 20 до 40 нм. *1мм=1000мкм, 1мкм=1000нм.*

2.Вирусы содержат нуклеиновую кислоту только одного типа- или ДНК (*ДНК- вирусы)* или РНК (*РНК- вирусы).* У всех остальных организмов геном представлен ДНК, в них содержится как ДНК, так и РНК.

3.Вирусы не способны к росту и бинарному делению.

4.Вирусы размножаются путем воспроизводства себя в инфицированной клетке хозяина за счет собственной геномной нуклеиновой кислоты.

5.У вирусов нет собственных систем мобилизации энергии и белок- синтезирующих систем, в связи с чем вирусы являются *абсолютными внутриклеточными паразитами.*

6.Средой обитания вирусов являются живые клетки- бактерии (это вирусы бактерий или бактериофаги), клетки растений, животных и человека.

Все вирусы существуют в двух качественно разных формах: внеклеточной- **вирион** и внутриклеточной- **вирус.** Таксономия этих представителей микромира основана на характеристике вирионов- конечной фазы развития вирусов.

Строение (морфология) вирусов.

1.*Геном вирусов* образуют нуклеиновые кислоты, представленные одноцепочечными молекулами РНК (у большинства РНК- вирусов) или двухцепочечными молекулами ДНК (у большинства ДНК- вирусов).

2.*Капсид* - белковая оболочка, в которую упакована геномная нуклеиновая кислота. Капсид состоит из идентичных белковых субъединиц- *капсомеров.* Существуют два способа упаковки капсомеров в капсид- спиральный (спиральные вирусы) и кубический (сферические вирусы).

При спиральной симметрии белковые субъединицы располагаются по спирали, а между ними, также по спирали, уложена геномная нуклеиновая кислота (нитевидные вирусы). *При кубическом типе симметрии* вирионы могут быть в виде многогранников, чаще всего- двадцатигранники - *икосаэдры.*

3.Просто устроенные вирусы имеют только *нуклеокапсид*, т.е. комплекс генома с капсидом и называются “голыми”.

4. У других вирусов поверх капсида есть дополнительная мембраноподобная оболочка, приобретаемая вирусом в момент выхода из клетки хозяина- *суперкапсид.* Такие вирусы называют “одетыми”.

Кроме вирусов, имеются еще более просто устроенные формы способных передаваться агентов - плазмиды, вироиды и прионы.

Основные этапы взаимодействия вируса с клеткой хозяина.

1.Адсорбция- пусковой механизм, связанный со взаимодействием *специфических* рецепторов вируса и хозяина (у вируса гриппа- гемагглютинин, у вируса иммунодефицита человека- гликопротеин gp 120).

2.Проникновение- путем слияния суперкапсида с мембраной клетки или путем эндоцитоза (пиноцитоза).

3.Освобождение нуклеиновых кислот- “раздевание” нуклеокапсида и активация нуклеиновой кислоты.

4.Синтез нуклеиновых кислот и вирусных белков, т.е. подчинение систем клетки хозяина и их работа на воспроизводство вируса.

5.Сборка вирионов- ассоциация реплицированных копий вирусной нуклеиновой кислоты с капсидным белком.

6.Выход вирусных частиц из клетки, приобретения суперкапсида оболочечными вирусами.

Исходы взаимодействия вирусов с клеткой хозяина.

1.*Абортивный процесс*- когда клетки освобождаются от вируса:

- при инфицировании *дефектным* вирусом, для репликации которого нужен вирус- помощник, самостоятельная репликация этих вирусов невозможна (так называемые вирусоиды). Например, вирус дельта (D) гепатита может реплицироваться только при наличии вируса гепатита В, его Hbs - антигена, аденоассоциированный вирус- в присутствии аденовируса);

- при инфицировании вирусом генетически нечувствительных к нему клеток;

- при заражении чувствительных клеток вирусом в неразрешающих условиях.

2.*Продуктивный процесс*- репликация (продукция) вирусов:

- *гибель (лизис) клеток* (цитопатический эффект)- результат интенсивного размножения и формирования большого количества вирусных частиц - характерный результат продуктивного процесса, вызванного вирусами с высокой цитопатогенностью. Цитопатический эффект действия на клеточные культуры для многих вирусов носит достаточно узнаваемый специфический характер;

- *стабильное взаимодействие*, не приводящее к гибели клетки (персистирующие и латентные инфекции) - так называемая *вирусная трансформация клетки.*

3.*Интегративный процесс*- интеграция вирусного генома с геномом клетки хозяина. Это особый вариант продуктивного процесса по типу стабильного взаимодействия. Вирус реплицируется вместе с геномом клетки хозяина и может длительно находиться в латентном состоянии. Встраиваться в ДНК- геном хозяина могут только ДНК- вирусы (принцип “ДНК- в ДНК”). Единственные РНК- вирусы, способные интегрироваться в геном клетки хозяина- ретровирусы, имеют для этого специальный механизм. Особенность их репродукции- синтез ДНК провируса на основе геномной РНК с помощью фермента обратной транскриптазы с последующим встраиванием ДНК в геном хозяина.

Основные методы культивирования вирусов.

1.В организме лабораторных животных.

2.В куриных эмбрионах.

3.В клеточных культурах - основной метод.

Типы клеточных культур.

1.*Первичные (трипсинизированные) культуры*- фибробласты эмбриона курицы (ФЭК), человека (ФЭЧ), клетки почки различных животных и т.д. Первичные культуры получают из клеток различных тканей чаще путем их размельчения и трипсинизации, используют однократно, т.е. постоянно необходимо иметь соответствующие органы или ткани.

2.*Линии диплоидных клеток* пригодны к повторному диспергированию и росту, как правило не более 20 пассажей (теряют исходные свойства).

3.*Перевиваемые линии* (гетероплоидные культуры), способны к многократному диспергированию и перевиванию, т.е. к многократным пассажам, наиболее удобны в вирусологической работе- например, линии опухолевых клеток Hela, Hep и др.

Специальные питательные среды для культур клеток.

Используются разнообразные синтетические вирусологические питательные среды сложного состава, включающие большой набор различных факторов роста- среда 199, Игла, раствор Хэнкса, гидролизат лактальбумина. В среды добавляют стабилизаторы pH (Hepes), различные в видовом отношении сыворотки крови (наиболее эффективной считают эмбриональную телячью сыворотку), L-цистеин и L-глютамин.

В зависимости от функционального использования среды могут быть *ростовые* (с большим содержанием сыворотки крови) - их используют для выращивания клеточных культур до внесения вирусных проб, и *поддерживающие* (с меньшим содержанием сыворотки или ее отсутствием)- для содержания инфицированных вирусом клеточных культур.

Выявляемые проявления вирусной инфекции клеточных культур.

1.Цитопатический эффект.

2.Выявление телец включений.

3. Выявление вирусов методом флюоресцирующих антител (МФА), электронной микроскопией, авторадиографией.

4.Цветная проба. Обычный цвет используемых культуральных сред, содержащих в качестве индикатора pH феноловый красный, при оптимальных для клеток условиях культивирования (pH около 7,2)- красный. Размножение клеток меняет pH и соответственно- цвет среды с красного на желтый за счет смещения pH в кислую сторону. При размножении в клеточных культурах вирусов происходит лизис клеток, изменения pH и цвета среды не происходит.

5.Выявление гемагглютинина вирусов- гемадсорбция, гемагглютинация.

6.Метод бляшек (бляшкообразования). В результате цитолитического действия многих вирусов на клеточные культуры образуются зоны массовой гибели клеток. Выявляют бляшки- вирусные “ клеточно- негативные” колонии.

Номенклатура вирусов.

Название семейства вирусов заканчивается на “viridae”, рода- “virus”, для вида обычно используют специальные названия, например - вирус краснухи, вирус иммунодефицита человека- ВИЧ, вирус парагриппа человека типа 1 и т.д.

Вирусы бактерий (бактериофаги).

Естественной средой обитания фагов является бактериальная клетка, поэтому фаги распространены повсеместно (например, в сточных водах). Фагам присущи биологические особенности, свойственные и другим вирусам.

Наиболее морфологически распространенный тип фагов характеризуется наличием головки- икосаэдра, отростка (хвоста) со спиральной симметрией (часто имеет полый стержень и сократительный чехол), шипов и отростков (нитей), т.е. внешне несколько напоминают сперматозоид.

Взаимодействие фагов с клеткой (бактерией) строго специфично, т.е. бактериофаги способны инфицировать только определенные виды и *фаготипы* бактерий.

Основные этапы взаимодействия фагов и бактерий.

1.Адсорбция (взаимодействие специфических рецепторов).

2.Внедрение вирусной ДНК (инъекция фага) осуществляется за счет лизирования веществами типа лизоцима участка клеточной стенки, сокращения чехла, вталкивания стержня хвоста через цитоплазматическую мембрану в клетку, впрыскивание ДНК в цитоплазму.

3.Репродукция фага.

4.Выход дочерних популяций.

Основные свойства фагов.

Различают *вирулентные фаги*, способные вызвать продуктивную форму процесса, и *умеренные фаги*, вызывающие редуктивную фаговую инфекцию (редукцию фага). В последнем случае геном фага в клетке не не реплицируется, а внедряется (интегрируется) в хромосому клетки хозяина (ДНК в ДНК), фаг превращается в *профаг.* Этот процесс получил название *лизогении*. Если в результате

внедрения фага в хромосому бактериальной клетки она приобретает новые наследуемые признаки, такую форму изменчивости бактерий называют *лизогенной (фаговой) конверсией.* Бактериальную клетку, несущую в своем геноме профаг, называют лизогенной, поскольку профаг при нарушении синтеза особого белка- репрессора может перейти в литический цикл развития, вызвать продуктивную инфекцию с лизисом бактерии.

Умеренные фаги имеют важное значение в обмене генетическим материалом между бактериями- *в трансдукции* (одна из форм генетического обмена). Например, способностью вырабатывать экзотоксин обладают только возбудитель дифтерии, в хромосому которого интегрирован умеренный профаг, несущий *оперон* tox, отвечающий за синтез дифтерийного экзотоксина. *Умеренный фаг tox вызывает лизогенную конверсию нетоксигенной дифтерийной палочки в токсигенную.*

По спектру действия на бактерии фаги разделяют на :

- поливалентные (лизируют близкородственные бактерии, например сальмонеллы);
- моновалентные (лизируют бактерии одного вида);
- типоспецифические (лизируют только определенные фаговары возбудителя).

На плотных средах фаги обнаруживают чаще с помощью спот (spot) - теста (образование негативного пятна при росте колоний) или методом агаровых слоев (титрования по Грациа).

Практическое использование бактериофагов.

1.Для идентификации (определение фаготипа).

2.Для фагопрофилактики (купирование вспышек).

3.Для фаготерапии (лечение дисбактериозов).

4.Для оценки санитарного состояния окружающей среды и эпидемиологического анализа.