



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра клинической лабораторной
диагностики и патологической анатомии с
курсом лабораторной микробиологии

Вирусы бактерий и человека

Миронов Андрей Юрьевич, профессор, д.м.н

Версия 2023г.,
г.Москва



Русский учёный Д. И. Ивановский (1864-1920) - первооткрыватель вирусов и основоположник вирусологии

В 1892 году описал необычные свойства возбудителя табачной мозаики – болезни табака, фильтрующегося через бактериальные фильтры вируса.

12 февраля 1892 – начинается отсчёт истории вирусологии

Значение вирусологии как науки:

- Ведущая роль вирусов в инфекционной патологии (ВИЧ, грипп, цитомегаловирус и другие герпесвирусы).
- Вирусы как модель в фундаментальных вопросах молекулярной биологии.

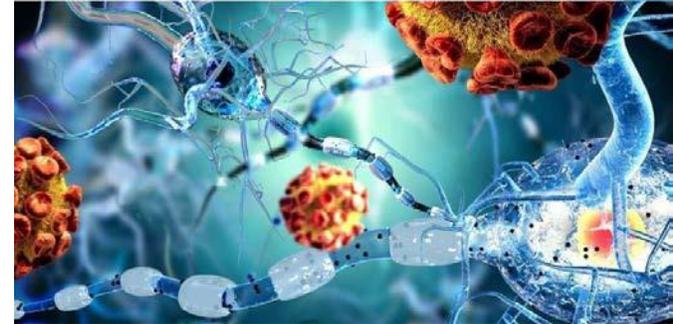
Происхождение вирусов

Проблема происхождения вирусов

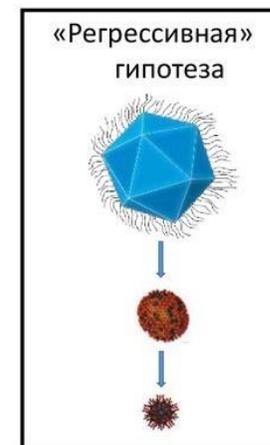
- Проблема появления первоначальных вирусных предков и этапов формирования специфических групп вирусов.
- Проблема происхождения современных вирусов, которые возникли намного позже первых вирусных прародителей, и непрерывно возникают в настоящее время.
- Вероятно, вирусы существовали миллиарды лет назад. До нашего времени не дошло никаких археологических окаменелостей, содержащих вирусы. В связи с этим процессы эволюции, происходящие в царстве *Vira*, изучаются на основе сравнительного анализа геномов вирусов, поражающих различных представителей живого мира, механизмов репликации вирусов и взаимоотношений с клеткой-хозяином.



Гипотезы происхождения вирусов



1. Вирусы являются потомками древних, доклеточных реликтовых форм жизни, перешедших к паразитическому способу существования. В современном понимании биологической эволюции эта теория более всего соответствует происхождению рибовирусов (**РНК-геномные вирусы, кроме ретровирусов**)
2. Вирусы - результат регрессивной эволюции (**вирусы - потомки бактерий, архей, эукариот**)
3. «Эндогенная теория» или теория «взбесившихся генов» (**вирусы - дериваты клеточных генетических структур, ставших относительно автономными, но сохранивших зависимость от клеток**) имеет множество подтверждений, т. к. объясняет происхождение целого ряда вирусов - ретровирусов и ряда ДНК-геномных вирусов.

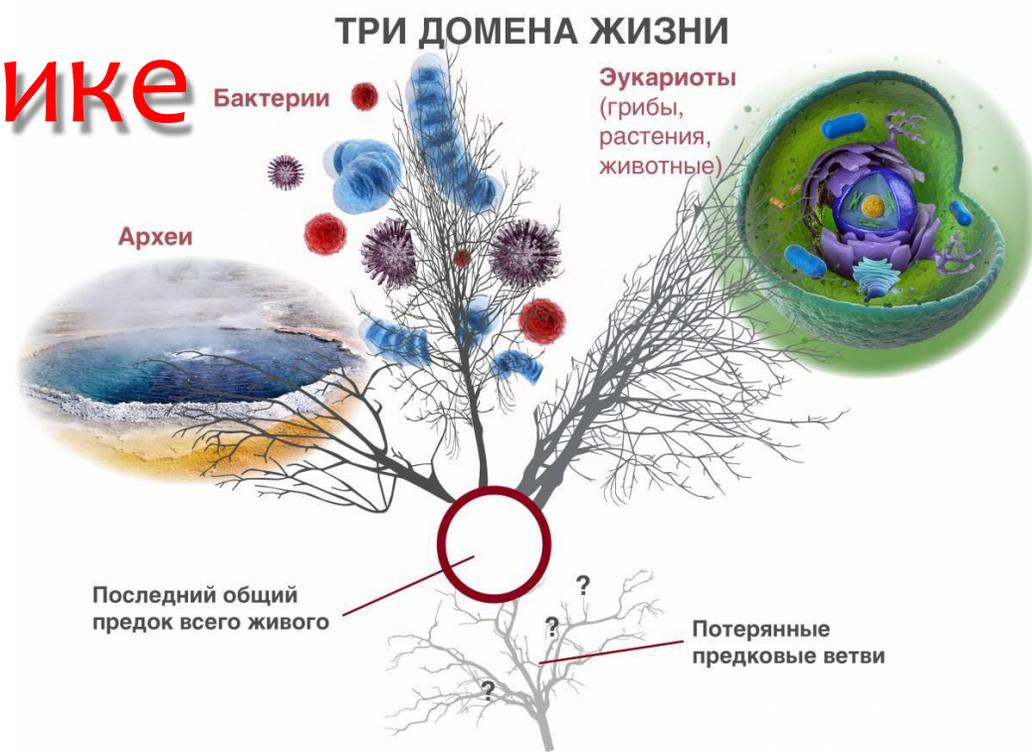


В клетках человека обнаружены сотни «чужеродных» генов

По-видимому, никто и никогда не узнает откуда возникли вирусы, это тайна, покрытая мраком, порождающая массу противоречивых мнений и догадок. В нашей жизни существует много таинственных загадок и только со временем приходит их понимание.

Гипотеза о предшественнике

- По данным эволюционных молекулярно-генетических исследований, вероятно, существовал общий предок бактерий, архей и эукариот, называемый LUCA - Last Universal Cellular Ancestor. Показано, что LUCA происходит из РНК-мира или мира РНК-белки.
- Это даёт определённое понимание о происхождении жизни, но не даёт ключей для обоснования и развития гипотез о происхождении жизни.
- При исследовании РНК-вирусных геномах, в частности, генов их РНК-полимераз, установлено, что все РНК вирусы имеют одного общего предка. По этому гену РНК-вирусы имеют общие корни с «прокариотическими» РНК-вирусами.
- Изначально существовал мир РНК-вирусов, позднее - ДНК-вирусов.



Классификация доклеточных форм патогенов

Патогены		Форма	Объём генома (число генов)	Хозяева	Вызываемые поражения
группа	природа				
Прионы	Инфекционный белок – изоформа белка хозяина	Ы Молекула	1	человек животные	Трансмиссивная губкообразная энцефалопатия (12 нозологий в т. ч. 4 у человека)
Трансмиссивные детерминанты патогенности	Транспозоны, плазмиды, элементы генома		1-80	человек животные бактерии	Токсигенность, лекарственная устойчивость и др.
Вироиды	Инфекционные РНК и ДНК		1-400	растения животные человек	Инфекционные болезни
Вирусы	РНК/ДНК + белок	частицы	10-500	человек животные растения	Вирусные инфекции

Вирусы (от лат. *virus* – яд) - наименьшие по размерам инфекционные агенты, имеющие геном, окруженный белковой оболочкой (капсидом).

Вирусы и плазмиды относят к царству **Vira**

Формы существования вирусов

- **вирион** - сформированная вирусная частица, существует вне клетки, содержит: нуклеиновую кислоту (геном), защитную протеиновую оболочку (капсид), структурные белки, ферменты
- **вирус** - внутриклеточная форма, представлен нуклеиновой кислотой

DINOSAURS OF THE ARCTIC ■ MASTERPIECES IN THE MIRROR

SCIENTIFIC AMERICAN

Tech Leaders
of 2004
The
Scientific American



DECEMBER 2004
WWW.SCIAM.COM

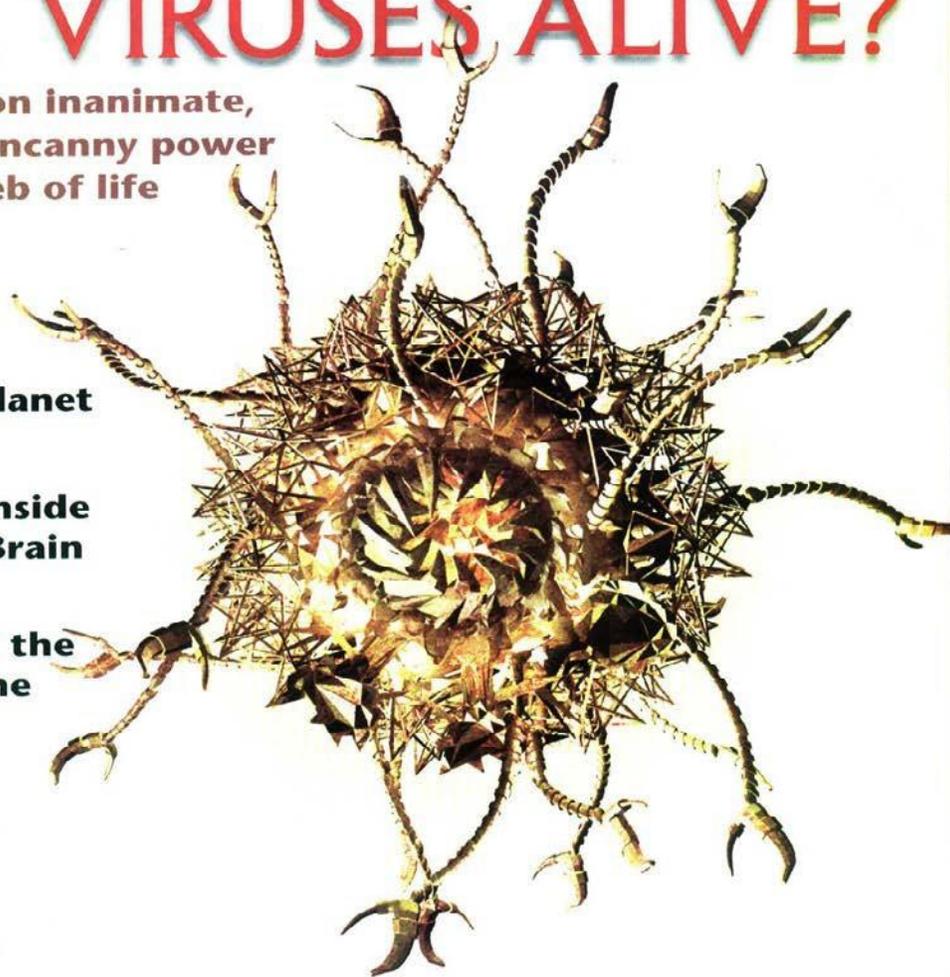
ARE VIRUSES ALIVE?

Bordering on inanimate,
they hold uncanny power
over the web of life

Stealing a Planet

The Drugs inside
Everyone's Brain

Defender of the
Male Genome



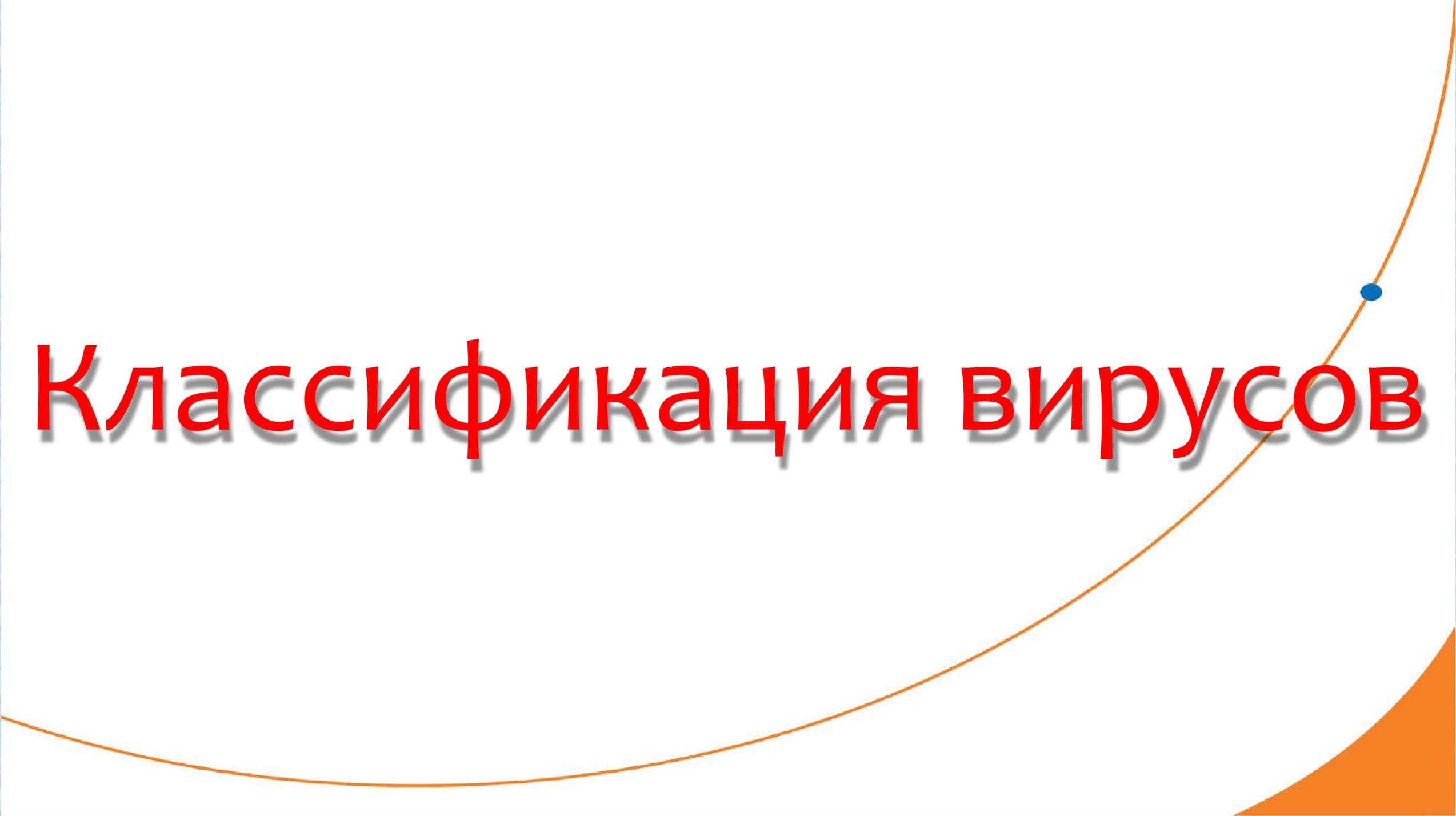
9 770036 873060 12>
\$4.99 U.K. £3.60

Вирус =
живое?

Особенности биологии вирусов

1. Отсутствие клеточного строения, роста, бинарного деления
2. Наличие только одного типа нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК): ДНК-геномные и РНК-геномные вирусы
3. Ультрамикроскопические размеры (нанометры, $1 \text{ мкм} = 1000 \text{ нм}$)
4. Не имеют собственного метаболизма
5. Не имеют белоксинтезирующих систем
6. Облигатные внутриклеточные паразиты
7. Не растут на питательных средах
8. Культивируются только на биологических моделях
9. Разобщённый (дисъюнктивный) способ репродукции - в живой клетке отдельно синтезируются нуклеиновые кислоты вирусов и их белки, затем происходит их сборка в вирусные частицы.
10. Универсальные паразиты
11. Паразиты на генетическом уровне
12. Возможность интеграции в клеточный геном и репликации с ним (ДНК-геномные вирусы, ретровирусы).

Классификация вирусов

A decorative orange arc curves across the bottom of the slide, starting from the left edge and ending at the top right corner. A small blue dot is positioned on the arc in the upper right quadrant.

Принципы классификации вирусов

- Тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК).
- Количество нитей нуклеиновой кислоты (одна или две).
- Стратегия вирусного генома.
- Тип симметрии.
- Размер и морфология вириона.
- Количество капсомеров.
- Наличие суперкапсида.
- Резистентность к детергентам, температуре, рН и др.
- Антигенная структура.
- Круг восприимчивых хозяев.
- Место размножения в клетке (ядро или цитоплазма).
- Географическое распространение
- Способ передачи.

Классификация вирусов

- Вирусы позвоночных
- Вирусы беспозвоночных
- Вирусы растений
- Вирусы грибов
- Вирусы бактерий

Таксономия вирусов

Классификацию определяет *Международный комитет по таксономии вирусов*. На основании критериев царство вирусов делится на типы, подтипы, классы, порядки, семейства, роды, виды.

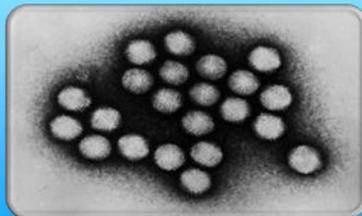
Современная база данных вирусов содержит: 3 порядка, 56 семейств (из них 22 патогенных для человека), 203 рода, 1550 видов вирусов.

Критерии классификации вирусов

- Тип нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК) и её первичная структура - (одно- или двунитчатая, линейная, циркулярная, непрерывная, фрагментированная).
- Характеристика вирионов: наличие белковой оболочки (капсида) и/или дополнительной липопротеидной оболочки (суперкапсида), размер и морфология, тип симметрии.
- Стратегия вирусного генома в клетке хозяина.
- Антигенные и физико-химические свойства.
- Феномены генетических взаимодействий.
- Экологические взаимодействия (круг восприимчивых хозяев, ареал распространения).
- Механизмы патогенности.
- Способы передачи и резистентность к факторам внешней среды.

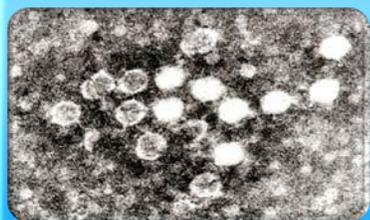
Классификация вирусов по Балтимору

классы I-IV



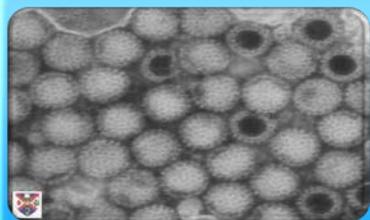
Класс I: двухнитевые ДНК (double stranded, d/s)

- **Семейства Adenoviridae, Poxviridae, Herpesviridae**



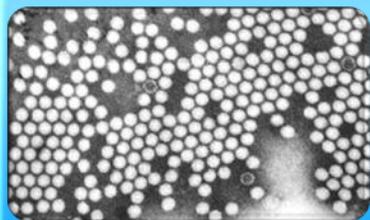
Класс II: однонитевые (+)ДНК (single stranded, s/s);

- **Семейства Parvoviridae** (Парвовирус человека B19), **Anelloviridae** (TT-virus, SEN-virus, TLMV)



Класс III: двунитевые РНК (d/s);

- **Семейства Reoviridae** (Ротавирусы, вирус Кемерово)



Класс IV: однонитевые (+)РНК (s/s +);

- **Семейства Picornaviridae, Caliciviridae, Herpesviridae, Astroviridae, Ровирусы, коронавирусы, флавивирусы, тогавирусы**

Viruses can be classified into seven (arbitrary) groups:
I: Double-stranded DNA (Adenoviruses; Herpesviruses; Poxviruses, etc)
II: Single-stranded (+)sense DNA (Parvoviruses) III: Double-stranded RNA (Reoviruses; Birnaviruses) IV: Single-stranded (+)sense RNA (Picornaviruses; Togaviruses, etc) V: Single-stranded (-)sense RNA (Orthomyxoviruses, Rhabdoviruses, etc) VI: Single-stranded (+)sense RNA with DNA intermediate in life-cycle (Retroviruses) VII: Double-stranded DNA with RNA intermediate (Hepadnaviruses)

Классификация вирусов по Балтимору

классы V-VII

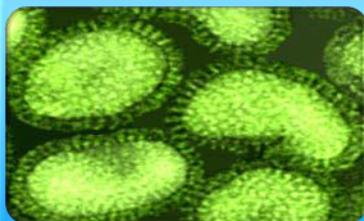
Выступающий
2021-03-20 14:10:13

Viruses can be classified into seven (arbitrary) groups:
I: Double-stranded DNA (Adenoviruses; Herpesviruses; Poxviruses, etc)
II: Single-stranded (+)sense DNA (Parvoviruses) III: Double-stranded RNA (Reoviruses; Birnaviruses) IV: Single-stranded (+)sense RNA (Picornaviruses; Togaviruses, etc) V: Single-stranded (-)sense RNA (Orthomyxoviruses, Rhabdoviruses, etc) VI: Single-stranded (+)sense RNA with DNA intermediate in life-cycle (Retroviruses) VII: Double-stranded DNA with RNA intermediate (Hepadnaviruses)



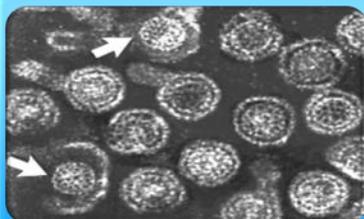
Класс V: однонитевые (-)РНК (s/s -);

- **Семейства:** Bornaviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Deltavirus, Arenaviridae



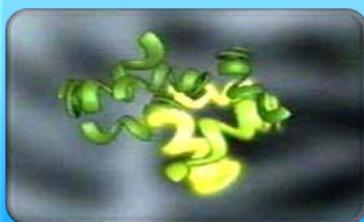
Класс VI: однонитевые (+)РНК (обратно транскрибирующиеся)

- **Семейство** Retroviridae



Класс VII: двунитевые ДНК(обратно транскрибирующиеся)

- **Семейство** Hepadnaviridae



Вироиды (небольшие молекулы кольцевой суперспирализованной РНК, не содержащие белка и вызывающие болезни растений);

Прионы – инфекционные белковые частицы, вызывающие конформационные болезни в результате изменения третичной или четвертичной структуры нормального клеточного протеина

Классификация и морфология вирусов

ВИРУСЫ С ОБОЛОЧКОЙ

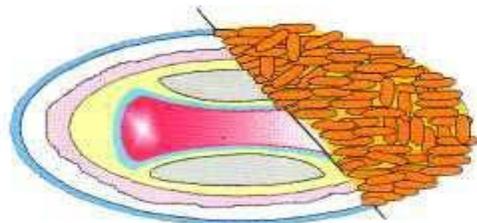
ДНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Herpesviridae



Hepadnaviridae

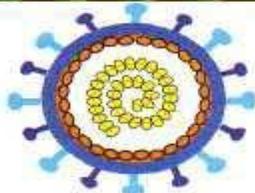


Poxviridae

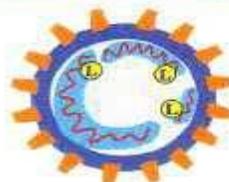
РНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



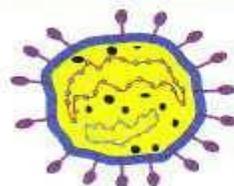
Coronaviridae



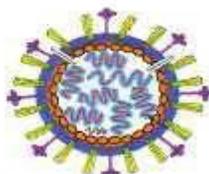
Paramyxoviridae



Bunyaviridae



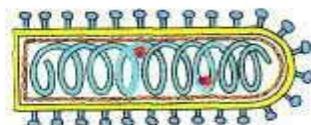
Arenaviridae



Orthomyxoviridae



Retroviridae



Rhabdoviridae



Togaviridae



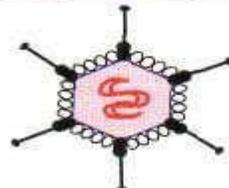
Flaviviridae



Filoviridae

ВИРУСЫ БЕЗ ОБОЛОЧКИ

ДНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Adenoviridae



Polyomaviridae

Papillomaviridae

ДНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Parvoviridae



Circinoviridae

РНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Reoviridae

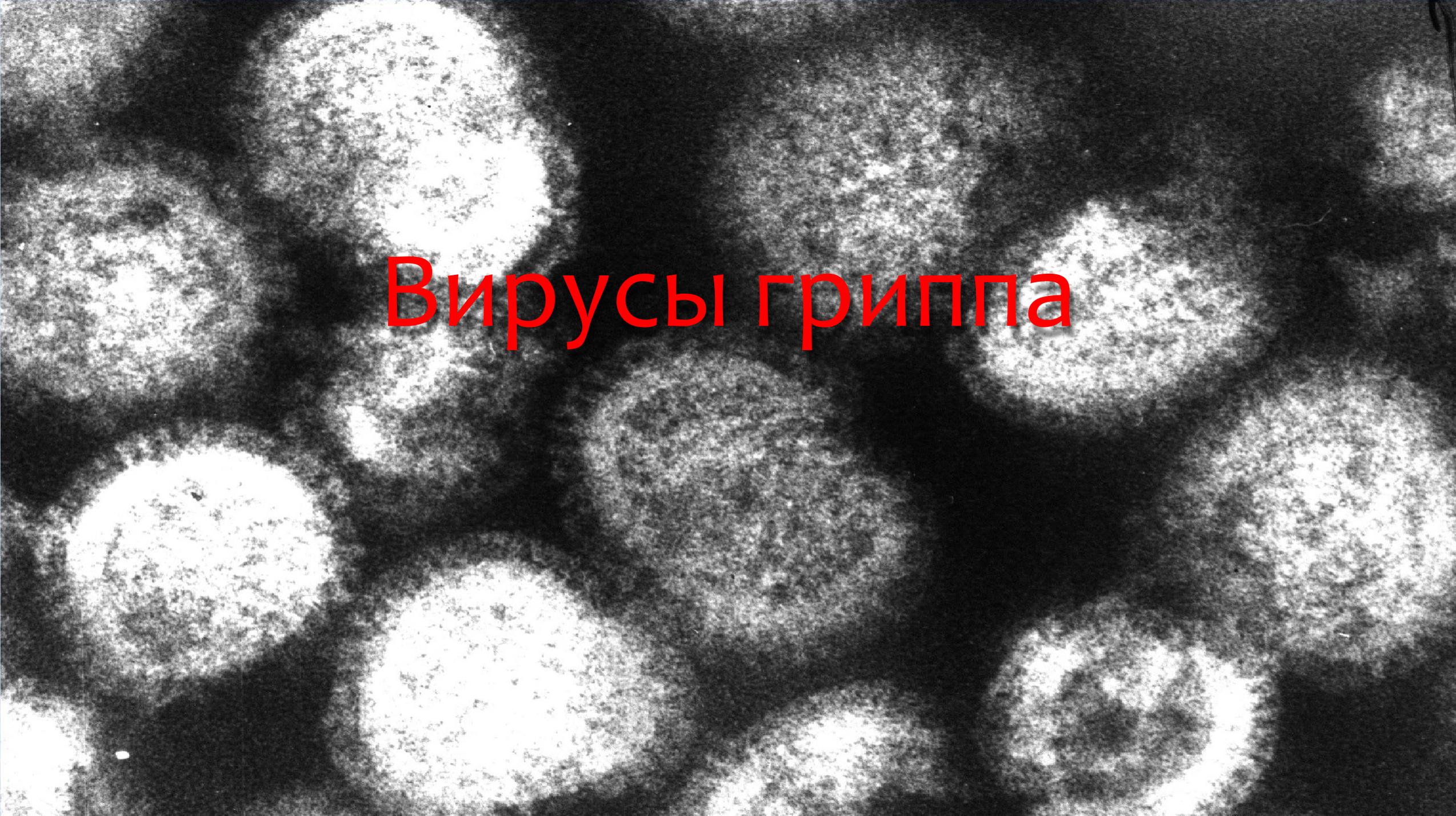
РНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



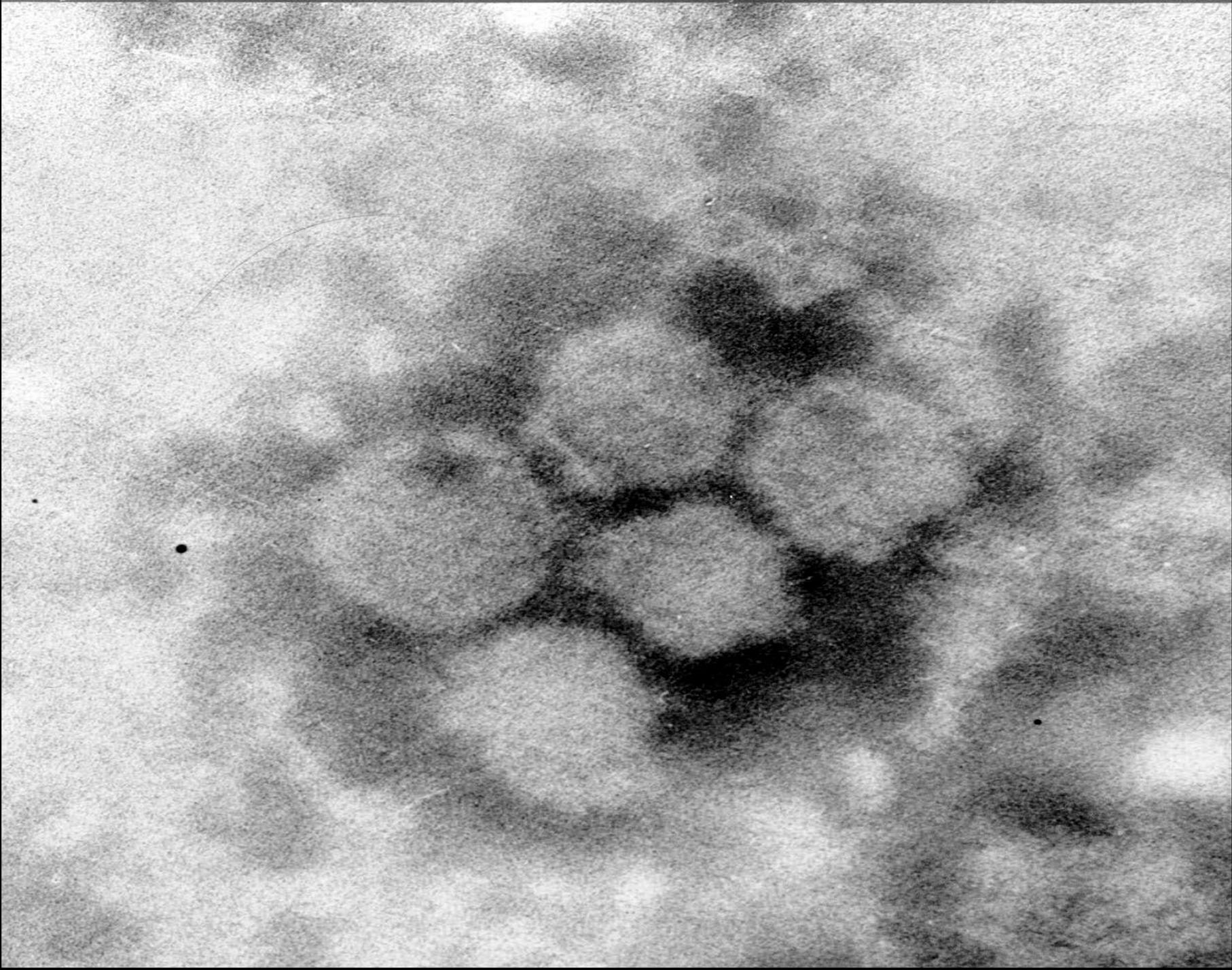
Picornaviridae



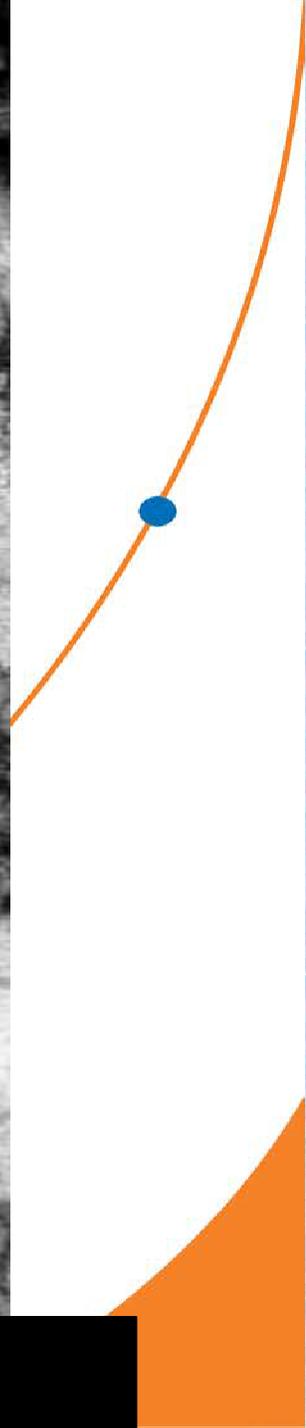
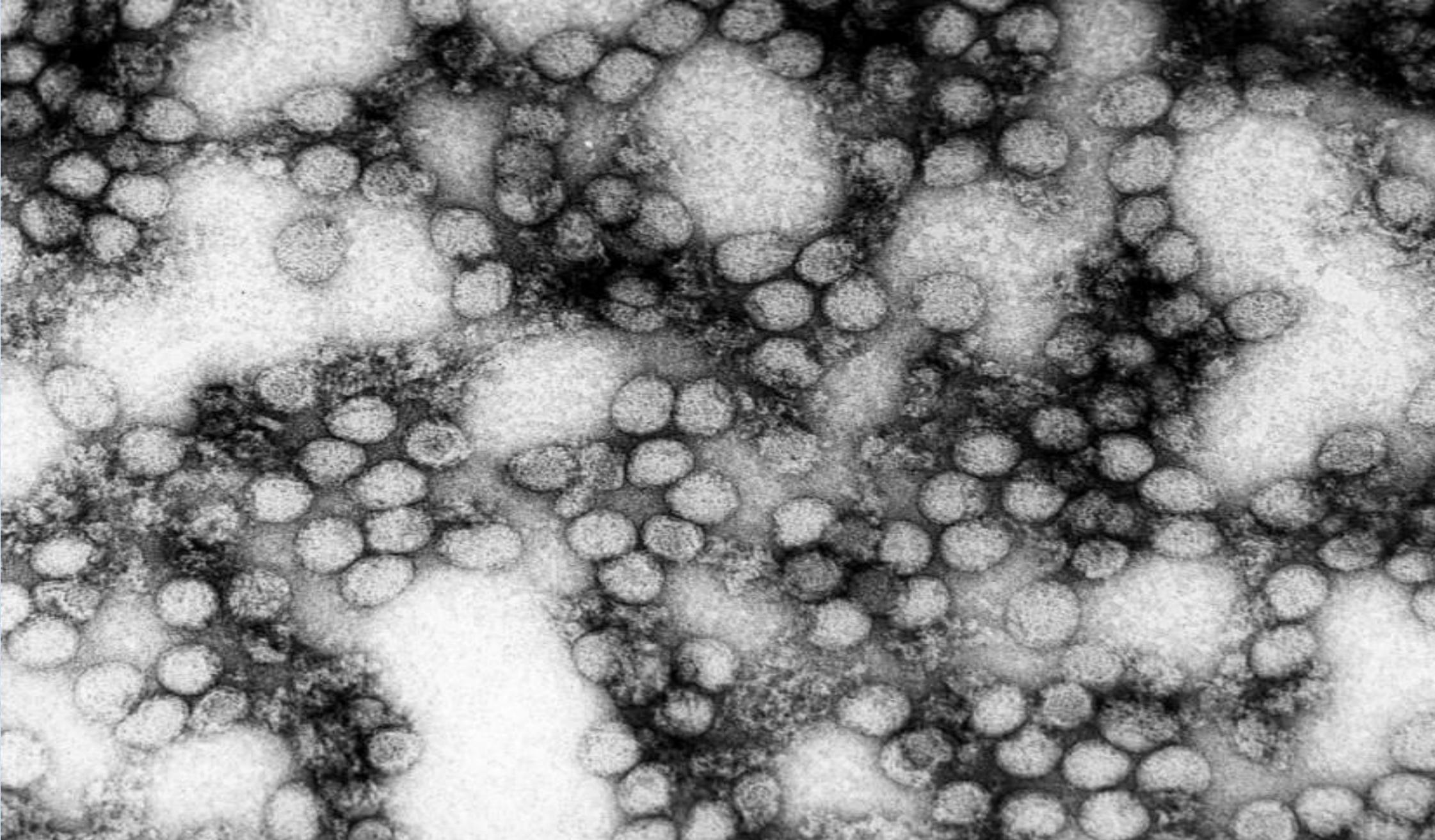
Caliciviridae

An electron micrograph showing several spherical influenza virus particles. The particles are roughly spherical and have a distinct outer shell (envelope) with a granular interior. They are scattered across the field of view against a dark background.

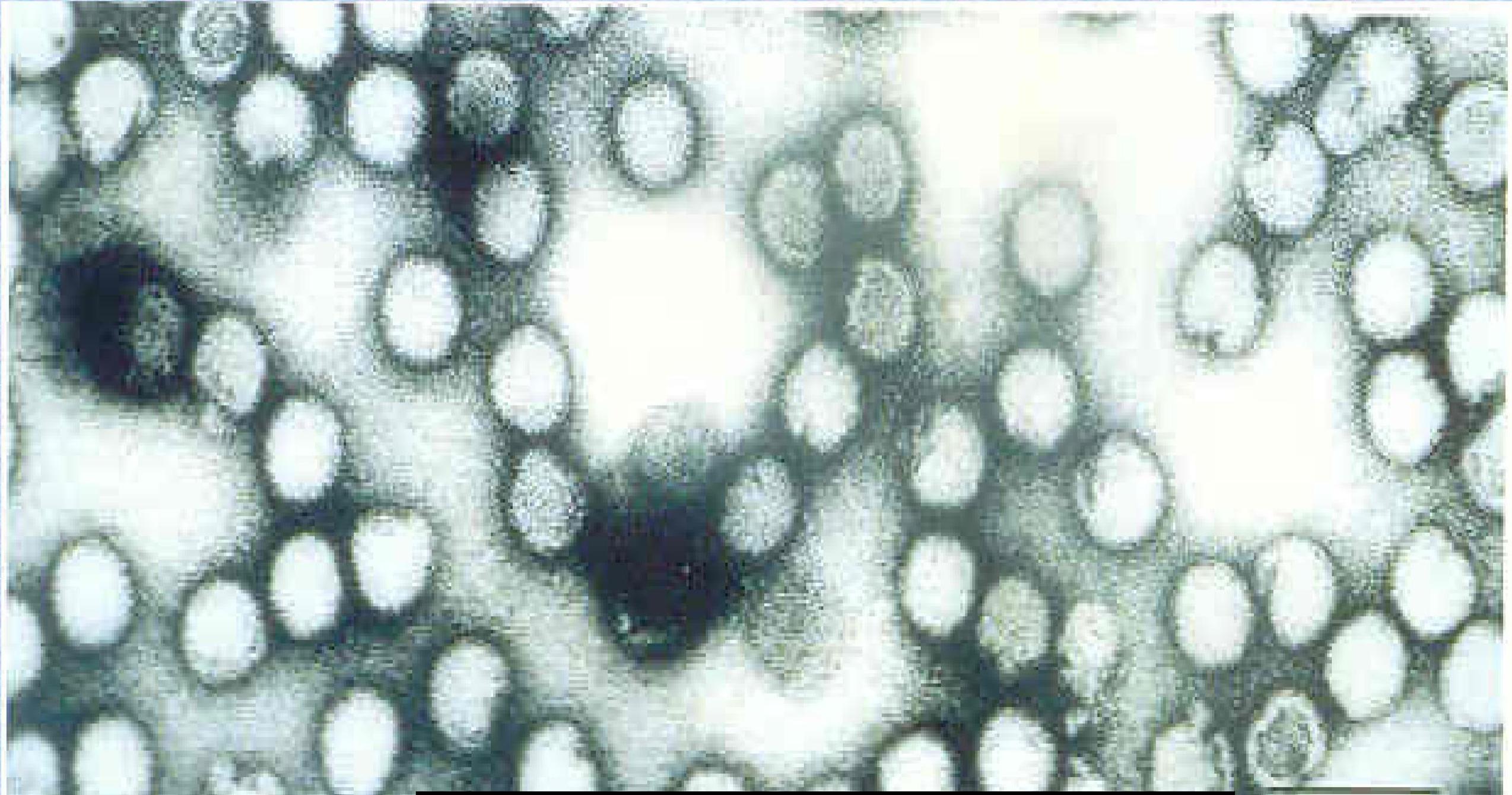
Вирусы гриппа



Вирус
краснухи

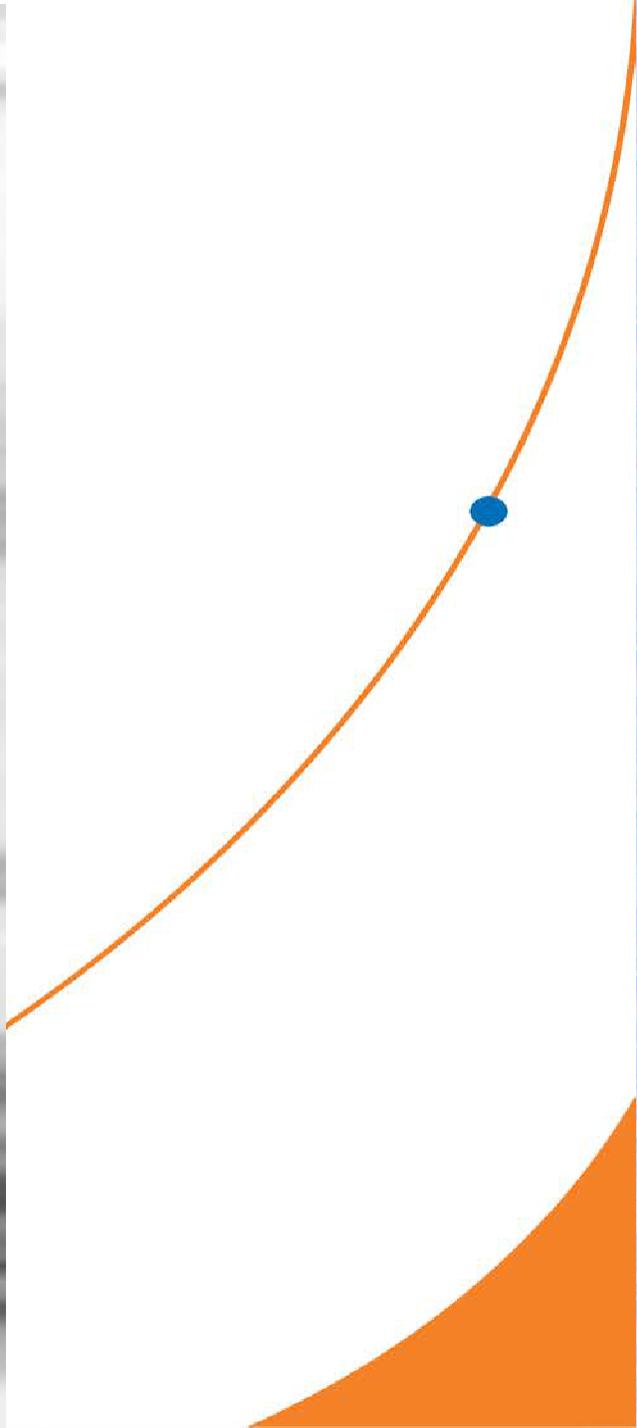
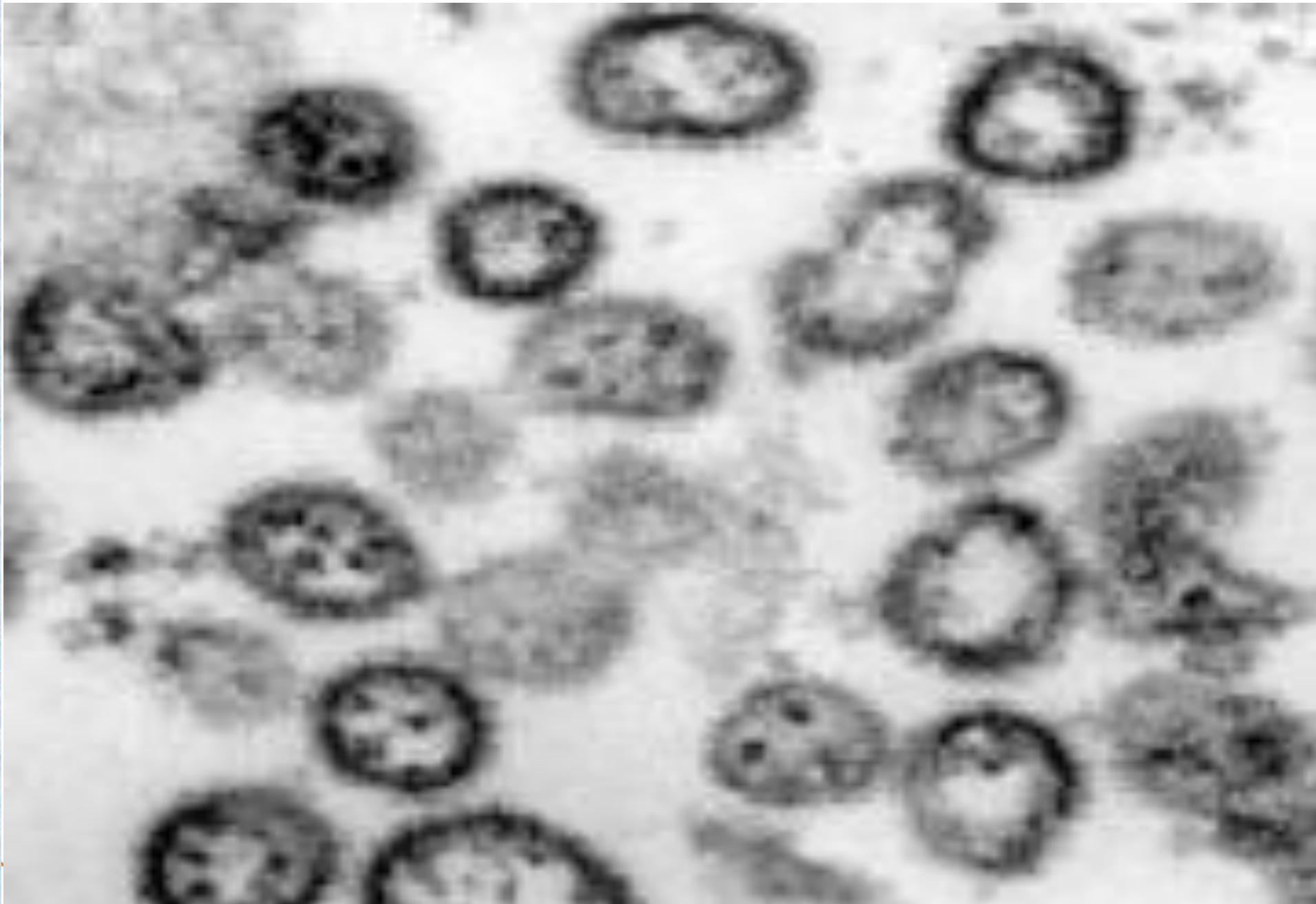


Вирус жёлтой лихорадки

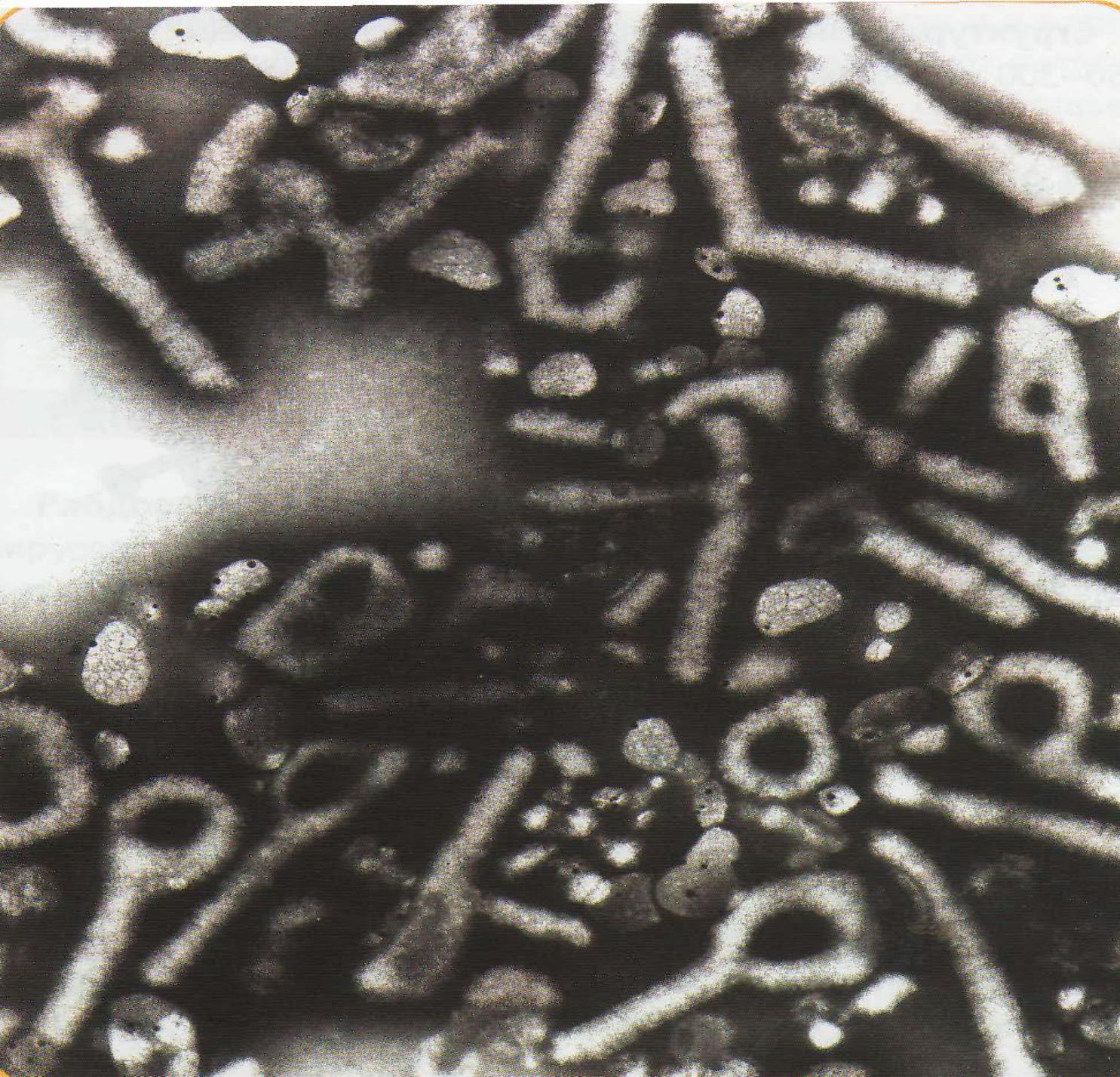


Вирус клещевого энцефалита

100 nm



Вирус лихорадки Ласса

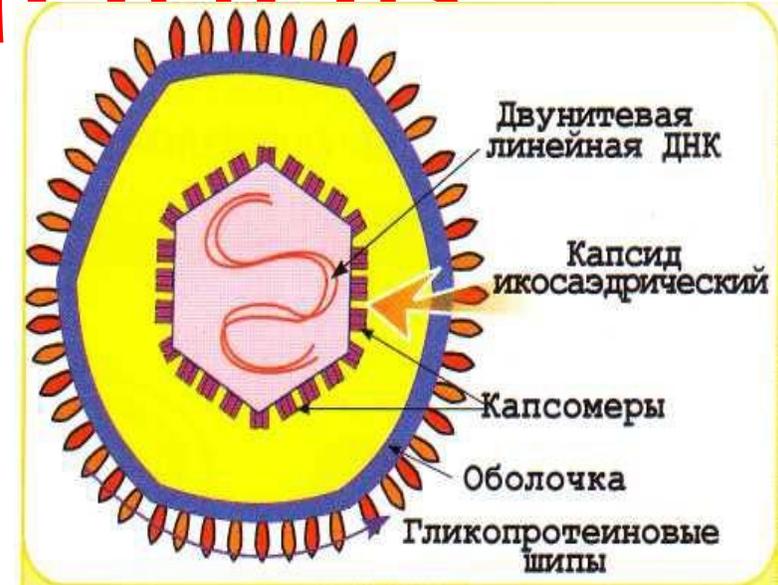
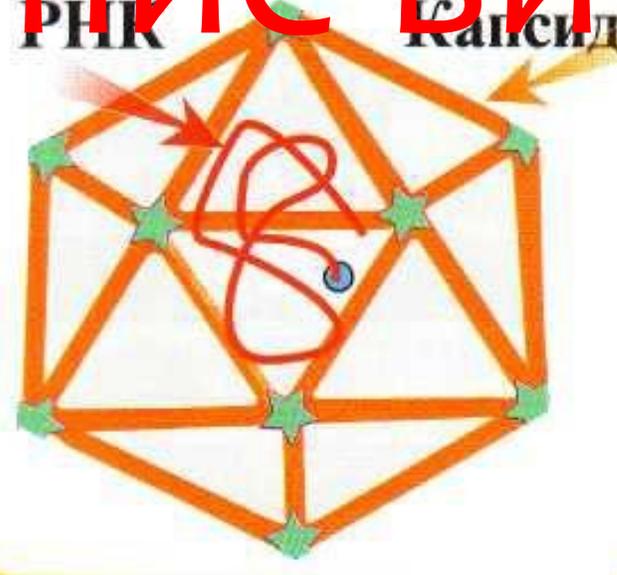


**Электроннограмма
вирионов вируса Эбола
(негативное
контрастирование)**



Вирион бешенства при
негативном
контрастировании
увеличение 260 тыс. раз

Строение вирионов



1. **Геном** (чаще – двуцепочечная ДНК или одноцепочечная РНК). Ферменты: репликации, транскрипции, участвующие в проникновении НК в клетку хозяина и выходе вирионов (нейраминидаза, лизоцим, АТФ-аза)
 2. **Капсид** (белковая оболочка) состоит из капсомеров. Спиральный и кубический тип упаковки капсомеров. Икосаэдры.
1+2=нуклеокапсид
 3. **Суперкапсид** – внешняя оболочка
- Простые** (голый нуклеокапсид) и **сложные** (имеют оболочку – суперкапсид) **вирусы**

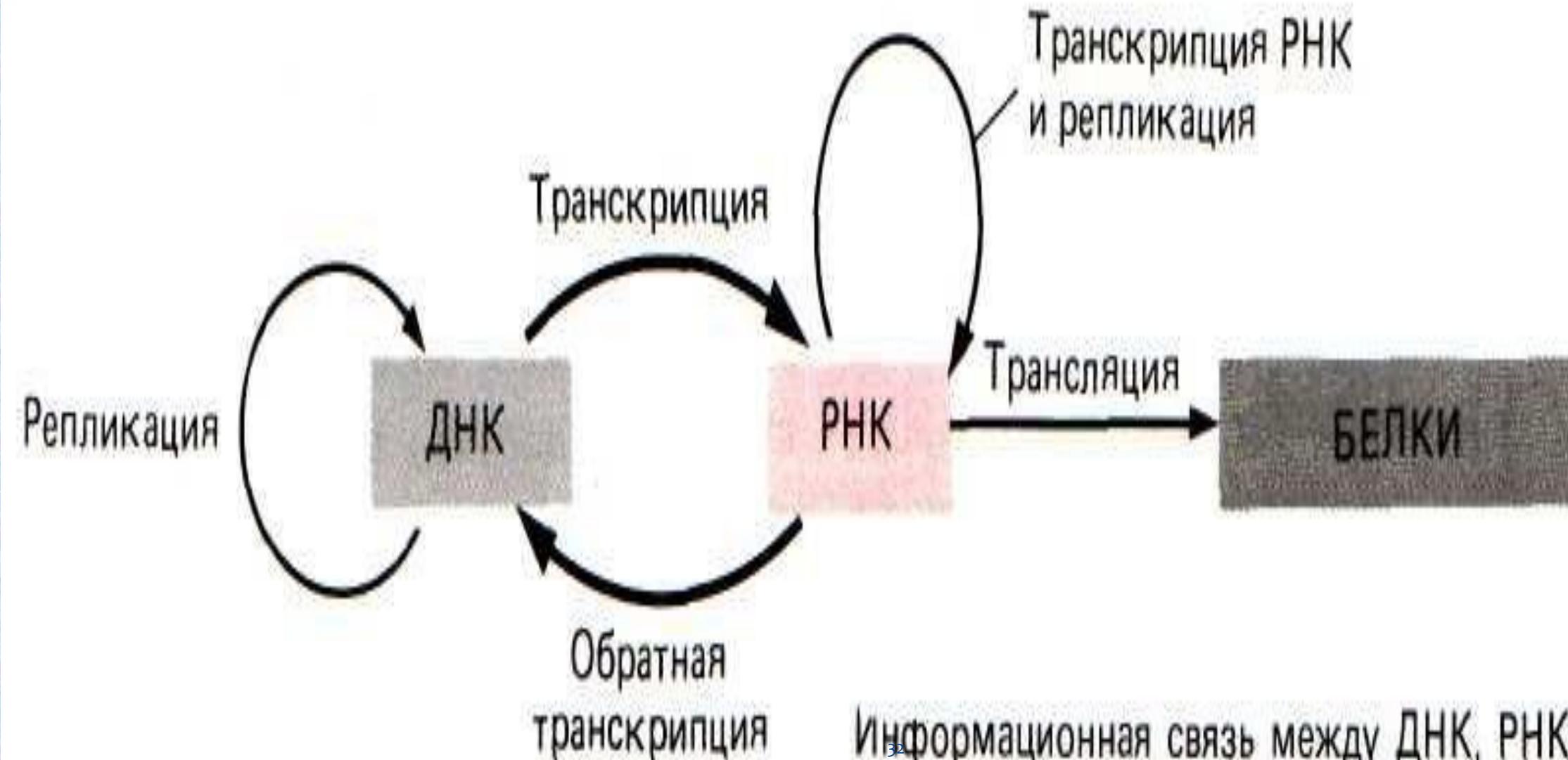
Типы взаимодействия вируса с клеткой хозяина

1. **Продуктивный:** гибель (лизис) клеток (ЦПД) или стабильное взаимодействие.
2. **Абортивный:** репродукция вируса прерывается на любой из стадий.
3. **Интегративный:** встраивание НК вируса в геном клетки, вирусная трансформация клетки.

Стадии взаимодействия вируса с клеткой

1. Адсорбция вируса на клетке – взаимодействие специфических рецепторов вириона и клетки хозяина. У ВИЧ: белок gp120 и CD₄ рецептор
2. Проникновение в клетку – путём слияния суперкапсида с мембраной клетки (**оболочечные вирусы**) или путём рецепторного эндоцитоза.
3. «Раздевание» - освобождение НК (**депротеинизация нуклеокапсида**).
4. Транскрипция (**синтез вирусных НК**).
5. Трансляция (**синтез вирусных белков**).
6. Репликация генома.
7. Сборка вирионов.
8. Выход вирусных частиц из клетки

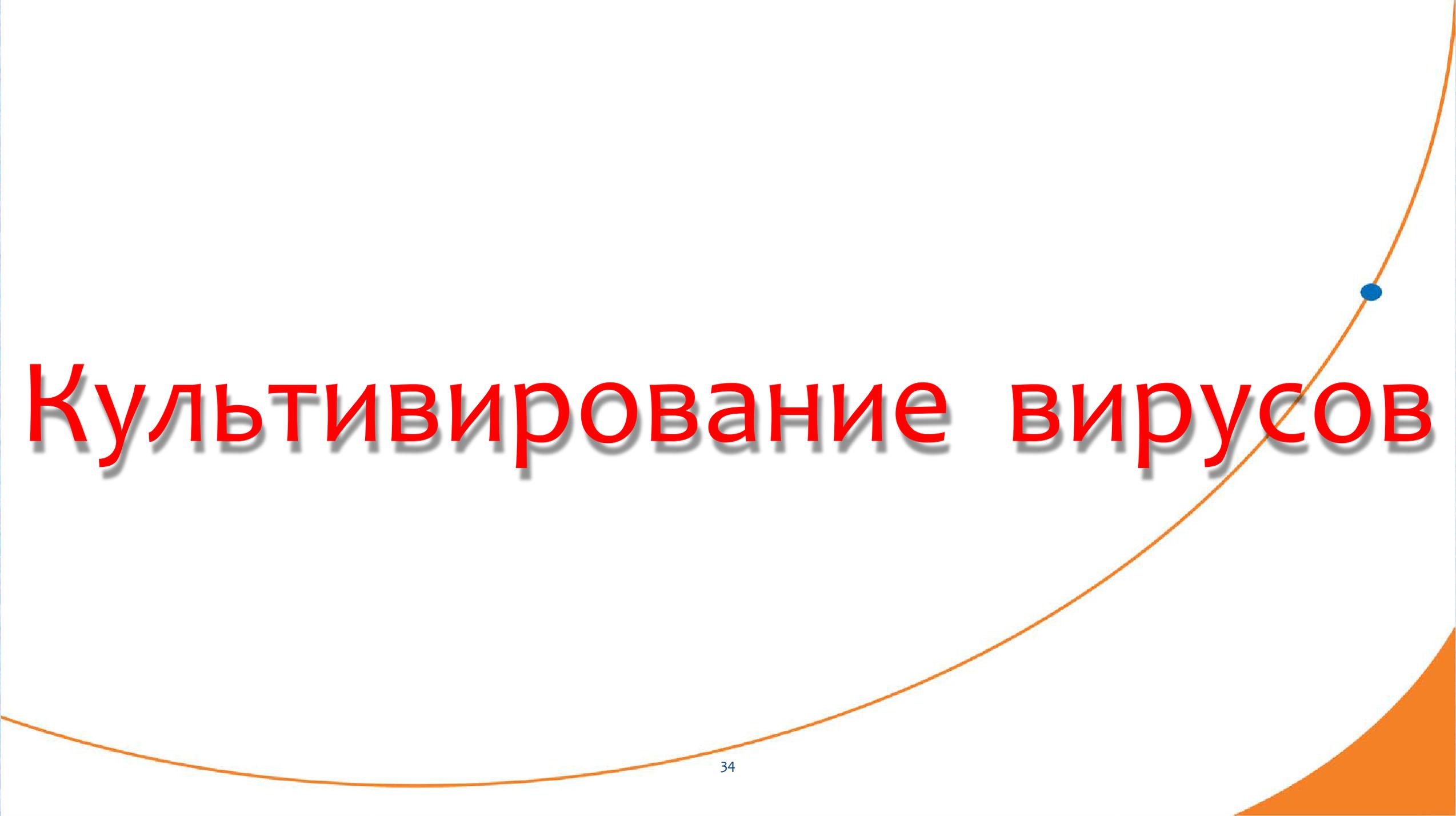
Генетика вирусов



Стратегия вирусного генома

1. Вирионная (матричная)+РНК → комплементарная -РНК (в рибосомах) → вирионная+РНК.
2. Вирионная негативная (-) РНК → информационная (матричная)+РНК → вирионная -РНК (на геноме клетки хозяина).
3. Однонитевая ДНК → -ДНК → +ДНК.
4. Ретровирусная РНК → ДНК копия (провирус) → РНК.
5. Двунитевая ДНК → разделение нитей → формирование на каждой комплементарной нити ДНК.

Культивирование вирусов

A decorative orange curve starts from the bottom left, curves upwards and to the right, and ends at the top right. A small blue dot is placed on the curve in the upper right quadrant.

Модели для культивирования вирусов

Вирусы

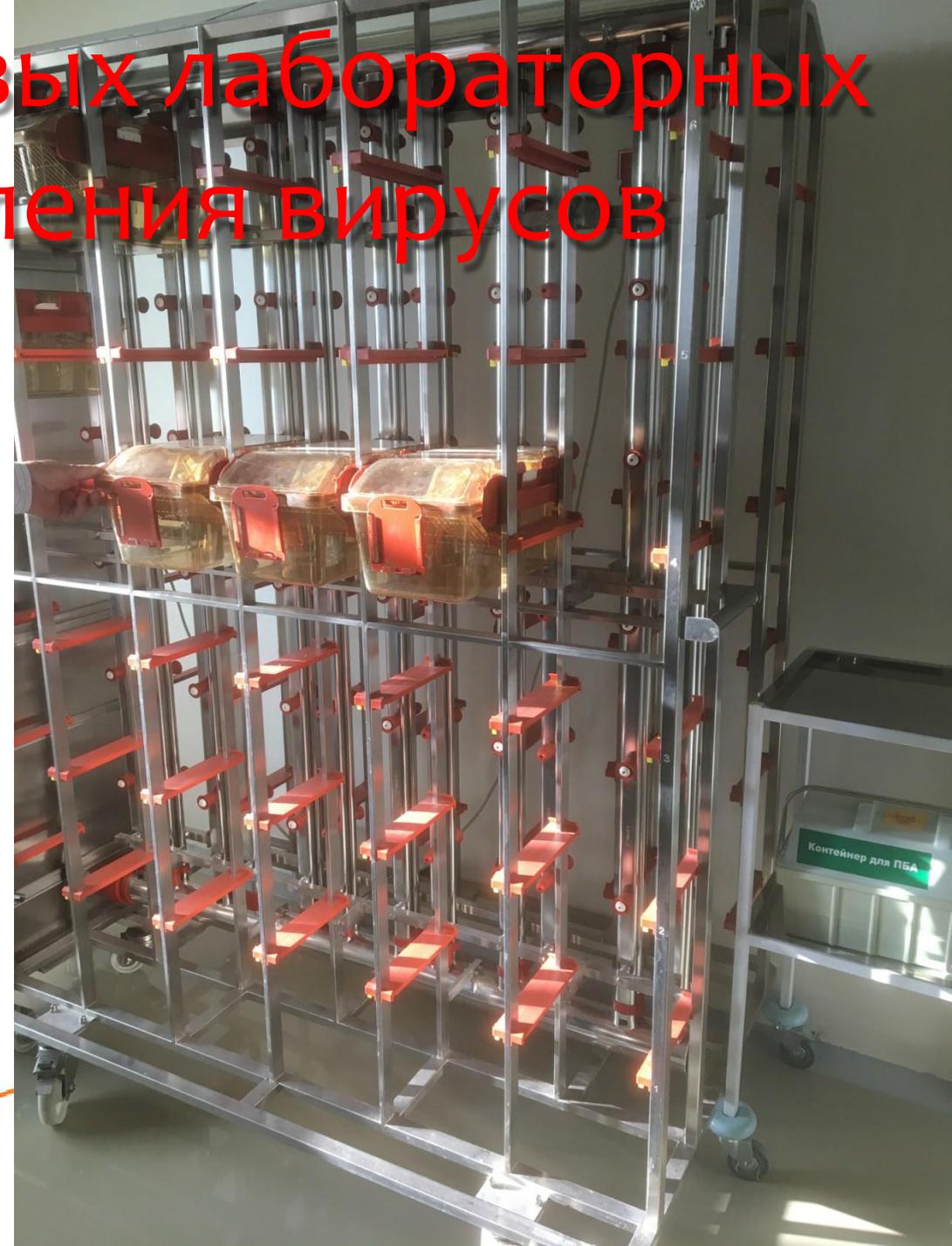
```
graph TD; A[Вирусы] --- B[лабораторные животные]; A --- C[развивающиеся куриные эмбрионы]; A --- D[культура клеток];
```

лабораторные
животные

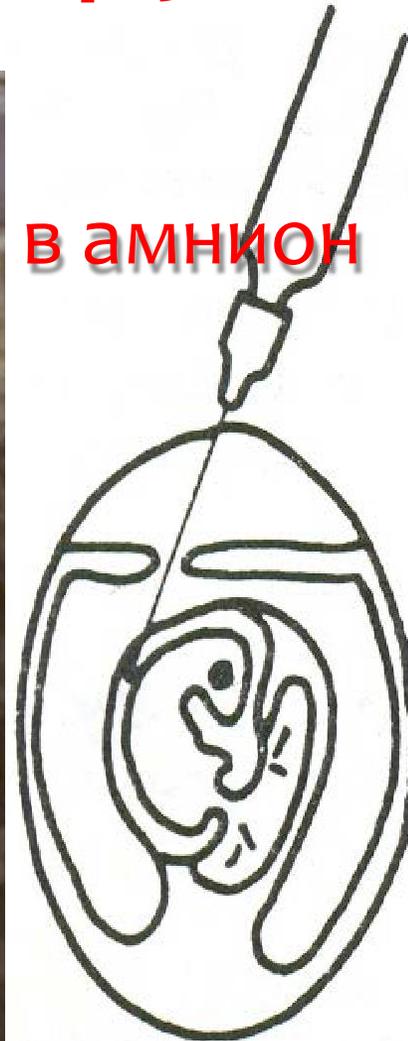
развивающиеся
куриные
эмбрионы

культура клеток

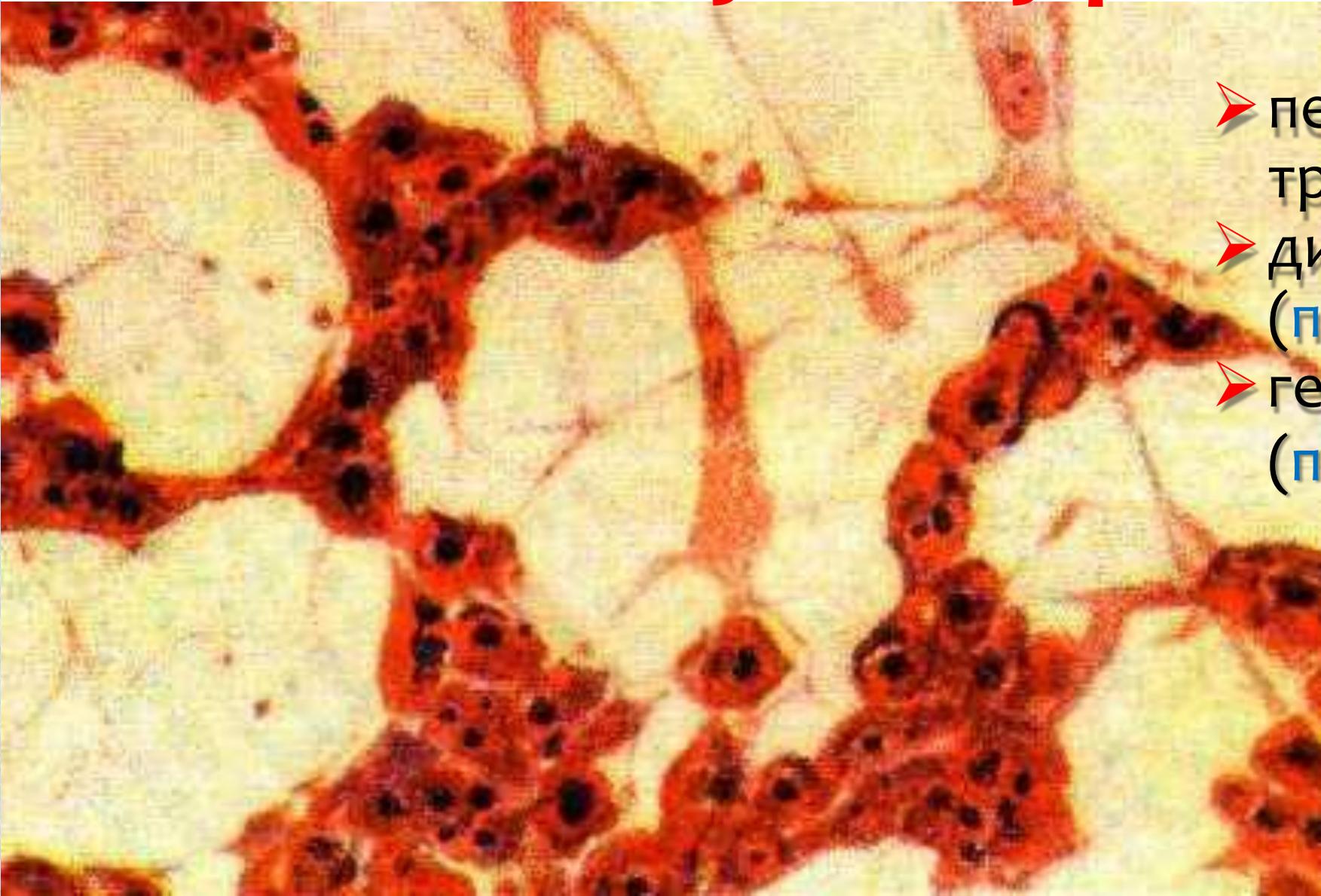
Заражение восприимчивых лабораторных животных для выделения вирусов



Заражение куриных эмбрионов для выделения вирусов



Типы культур клеток



- первично-трипсинизированные
- диплоидные (полуперевиваемые)
- гетероплоидные (перевиваемые)

Наиболее опасные вирусы человека

Хантавирусы передаются человеку при контакте с грызунами или продуктами их жизнедеятельности, вызывая геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (смертность около 12%) или хантавирусный кардиопульмональный синдром (смертность до 36%).

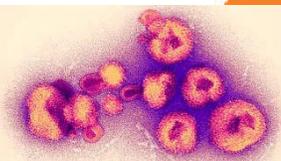
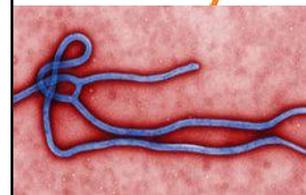
Вирус гриппа - вызывает у человека острое инфекционное поражение дыхательных путей. Выделяют 3 сероварианта этого вируса (А, В, С). Группа вируса из серотипа А разделённая на штаммы (H1N1, H2N2, H3N2 и т. д.) наиболее опасна для человека и может привести к эпидемии и пандемии.

Вирус Марбург - опасный вирус человека, описан в 1967 году во время вспышек в немецких городах Марбург и Франкфурт, вызывающий у человека геморрагическую лихорадку Марбург (смертность 23-50%). Инфекция передаётся с кровью, калом, слюной и рвотными массами больных людей, которые являются естественным резервуаром. Грызуны и некоторые виды обезьян так же являются естественным резервуаром. Инфекция проявляется лихорадкой, головной болью и болью в мышцах, позднее - желтухой, панкреатитом, потерей веса, делирием, неврологическими симптомами и расстройствами психики, кровотечением, гиповолемическим шоком и множественными отказами органов (чаще всего печени). Лихорадка Марбург входит в десятку смертельных болезней передающихся от животных.

Вирус бешенства - опасный вирус, вызывающий бешенство у человека и теплокровных животных, при котором происходит специфическое поражение центральной нервной системы. Болезнь передаётся со слюной при укусе инфицированного животного. Сопровождается повышением температуры до 37,2–37,3, плохим сном, больные становятся агрессивными, буйными, появляются галлюцинации, бред, чувство страха, вскоре наступает паралич глазных мышц, нижних конечностей, паралитические расстройства дыхания и смерть. Первые признаки болезни возникают поздно, когда в мозгу уже произошли разрушительные процессы (отёк, кровоизлияние, дегенерация нервных клеток), что делает лечение практически невозможным.

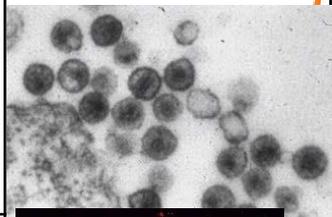
Вирус Эбола - вызывает геморрагическую лихорадку Эбола (по названию реки в Заире, ДР Конго). Передаётся при прямом контакте с кровью, выделениями, другими жидкостями и органами инфицированного человека. Лихорадка Эбола характеризуется внезапным повышением температуры тела, выраженной общей слабостью, мышечными и головными болями, а также болью в горле. Сопровождается рвотой, диареей, сыпью, нарушением функций почек и печени, кровотечениями. Летальность до 42%.

Вирус Ласса - смертельный вирус, поражающий человека и приматов. Болезнь характеризуется тяжёлым течением, поражением органов дыхания, почек, центральной нервной системы, миокардитом и геморрагическим синдромом. Встречается преимущественно в странах Западной Африки, (Сьерра-Леоне, Республике Гвинея, Нигерии и Либерии). Природным резервуаром лихорадки Ласса являются многососковые крысы.

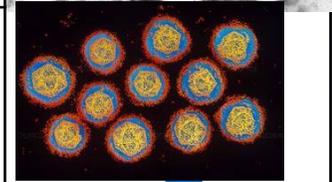


Наиболее опасные вирусы человека

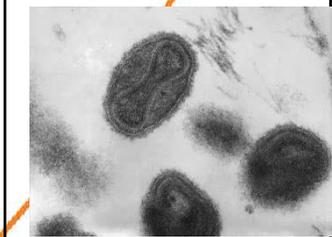
Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) – самый опасный вирус человека, возбудитель ВИЧ-инфекции/СПИД, который передаётся через прямой контакт слизистых оболочек или крови больного. В ходе ВИЧ-инфекции у человека формируются всё новые мутанты вируса, которые способны инфицировать и убивать клетки иммунной системы. Без врачебного вмешательства средняя продолжительность жизни человека заражённого вирусом иммунодефицита составляет 9-11 лет.



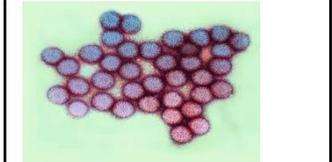
Вирус денге - один из самых опасных вирусов для человека, вызывающий Лихорадку денге со смертностью около 50%. Болезнь характеризуется лихорадкой, интоксикацией, миалгией, артралгией, сыпью, увеличением лимфатических узлов. Встречается в основном в странах Южной и Юго-Восточной Азии, Африки, Океании и Карибского бассейна. Разносчиками вируса является больной человек, обезьяны, комары и летучие мыши.



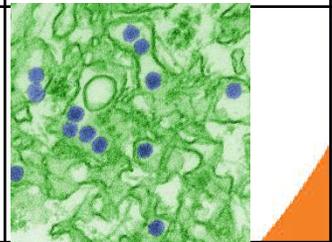
Вирус натуральной оспы - сложный вирус, возбудитель высокозаразного одноимённого заболевания, поражающего только человека. Это одно из древнейших заболеваний, симптомами которого является озноб, боль в области крестца и поясницы, быстрое повышение температуры тела, головокружение, головная боль, рвота. На второй день появляются сыпь, которая со временем превращается в гнойные пузырьки. Последний известный случай заражения был зарегистрирован 26 октября 1977 года в сомалийском городе Марка.



Ротавирус - распространённая причина острой диареи у младенцев и детей младшего возраста. Передаётся фекально-оральным путём.



Вирус Зика - РНК-содержащий арбовирус. Инфекция характеризуется внезапным началом с доминированием одного или нескольких симптомов в начале заболевания в виде слабости, головной боли, лихорадки, мелко-пятнистой сыпи, миалгий и артралгий, конъюнктивита, иктеричности кожных покровов и слизистых оболочек. Возможны вторичные органические поражения - общемозговая и/или очаговая неврологическая симптоматика, симптомы поражения печени и почек, сосудистые поражения в виде мелко-точечных высыпаний и кровотечений.



Борнавирус - РНК-содержащий вирус, обнаруживается в крови людей, страдающих такими нарушениями психической деятельности как шизофрения, шизоаффективный, психоз и др.



Методы диагностики вирусных инфекций

- Вирусоскопический
- Вирусологический
- Серологический

Вирусоскопический метод заключается в обнаружении вируса в исследуемом материале под микроскопом. Чаще всего используют электронный микроскоп, реже люминисцентный. Световая микроскопия из-за ничтожно малых размеров вирусов практически не применяется. Лишь для обнаружения крупных вирусов, используя методы «сверхокраски», можно применить световой микроскоп. С помощью светового микроскопа можно выявить внутриклеточные включения, которые образуются в поражённых клетках при некоторых инфекциях.



Клетки цилиндрического эпителия, инфицированные вирусом гриппа А (РИФ)

Вирусологический метод заключается в заражении исследуемым материалом чувствительной биологической модели (лабораторные животные, куриные эмбрионы или культуры клеток), индикации вируса и его последующей идентификации.

При заражении лабораторных животных индикация вирусов производится, как правило, по клинической картине болезни, патологоанатомическим изменениям ориентировочно и окончательно, например, с помощью РГА. РГА позволяет выявить вирусы в курином эмбрионе, видимых изменений при вскрытии которого, как правило, не наблюдается. В культуре клеток наличие вируса определяют по ЦПД (в том числе образованию внутриклеточных включений), гемадсорбции, феномену бляшкообразования, РГА, отсутствию изменения окраски индикатора. Идентификация вируса осуществляется с помощью серологических реакций (РПГА, РТГА, РН, РСК, ИФА и др.).

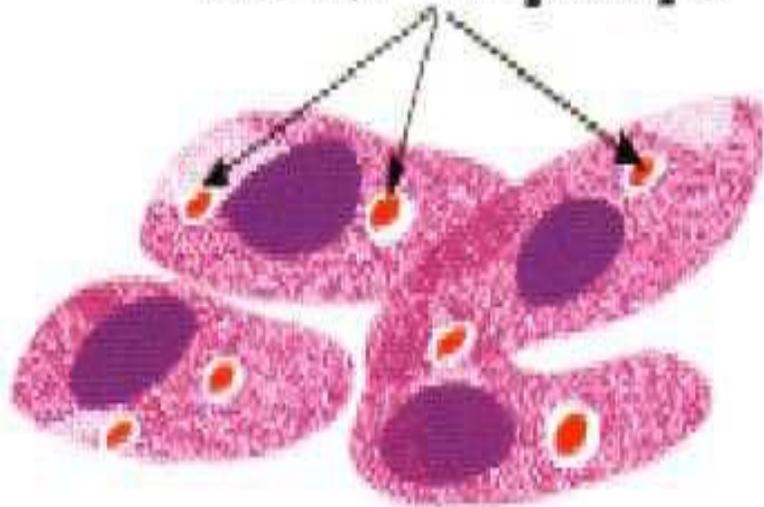
Индикация вирусов в культуре клеток



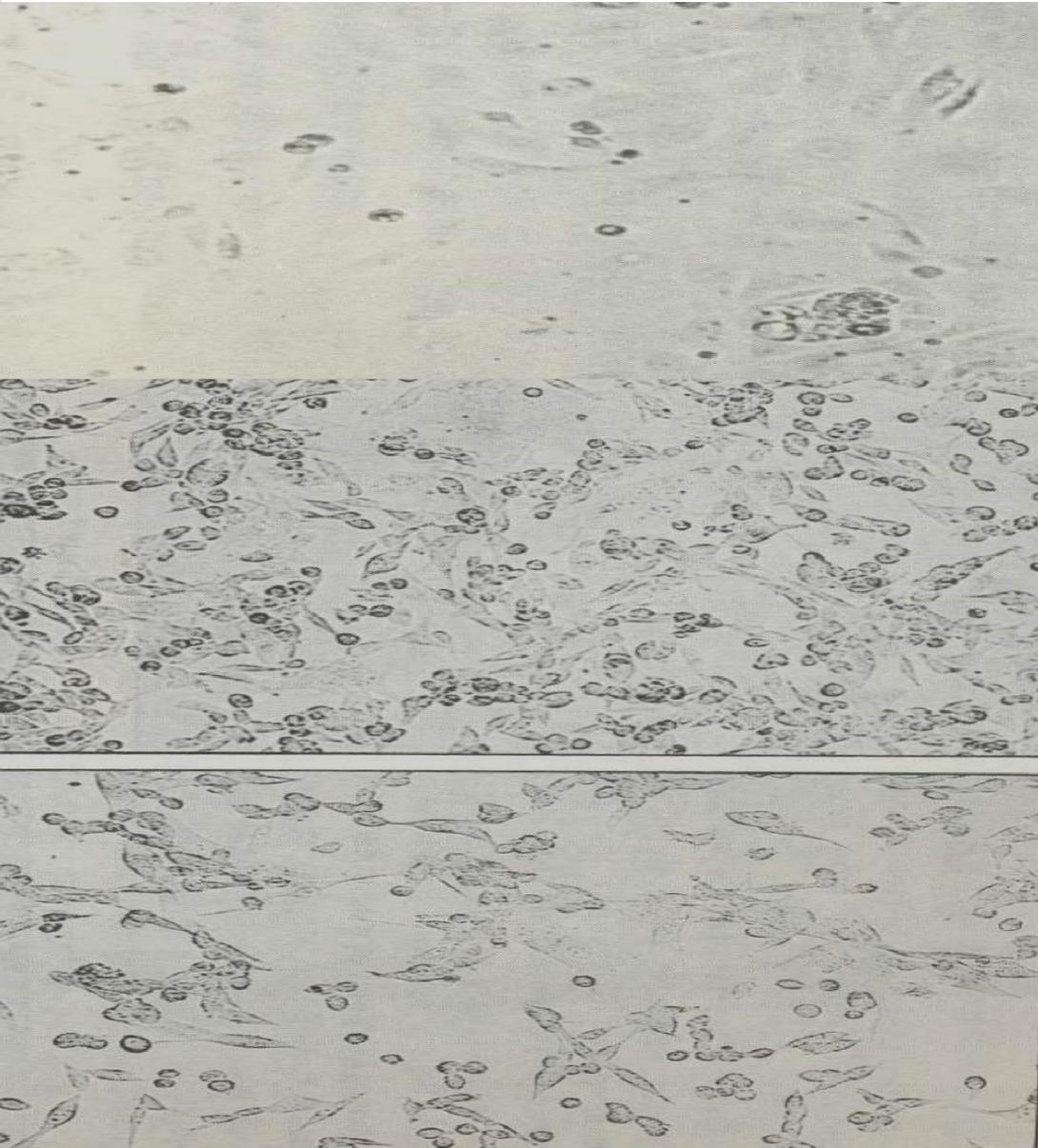
Проводится на основе: цитопатогенного действия (ЦПД) вирусов, образования внутриклеточных включений, образования бляшек, реакций гемадсорбции и гемагглютинации, «цветной» пробы, классических (РН, РСК, РТГА) и современных методов идентификации (РИФ, ИФА, ПЦР).

ЦПД - видимые под микроскопом морфологические изменения клеток (вплоть до их отторжения от стекла), возникающие в результате внутриклеточной репродукции вирусов. **Включения** - скопление вирионов или отдельных их компонентов в цитоплазме или ядре клеток, выявляемые под микроскопом при специальном окрашивании. Вирус натуральной оспы образует цитоплазматические включения - тельца Гварниери; вирусы герпеса и аденовирусы - внутриядерные включения

Тельца Гварниери



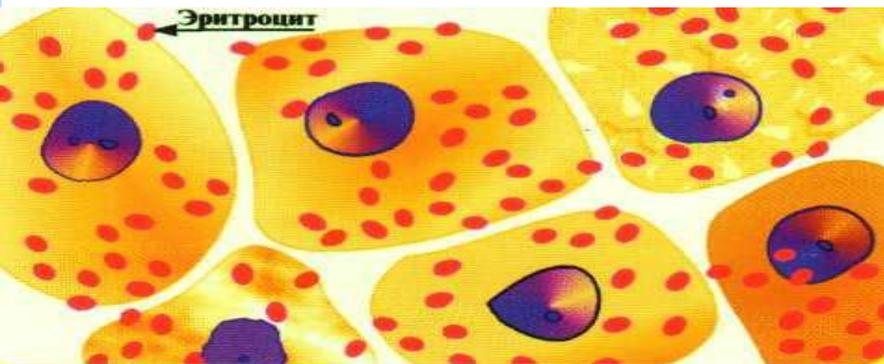
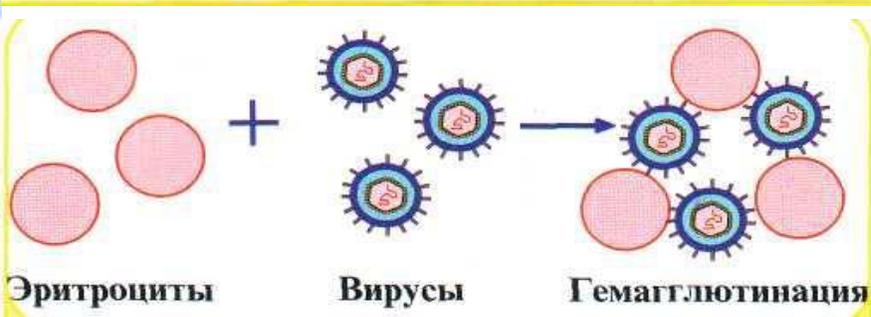
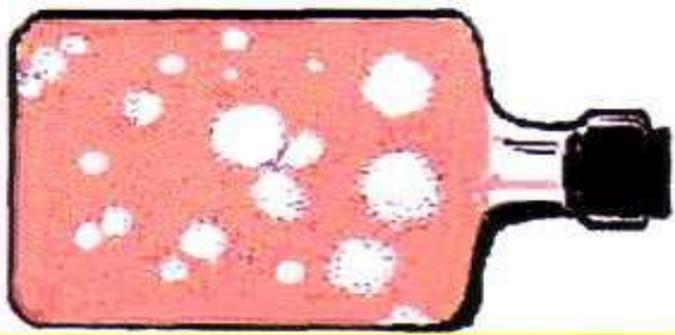
ЦПД в культуре клеток MDCK



перед заражением

24-48 часов после заражения

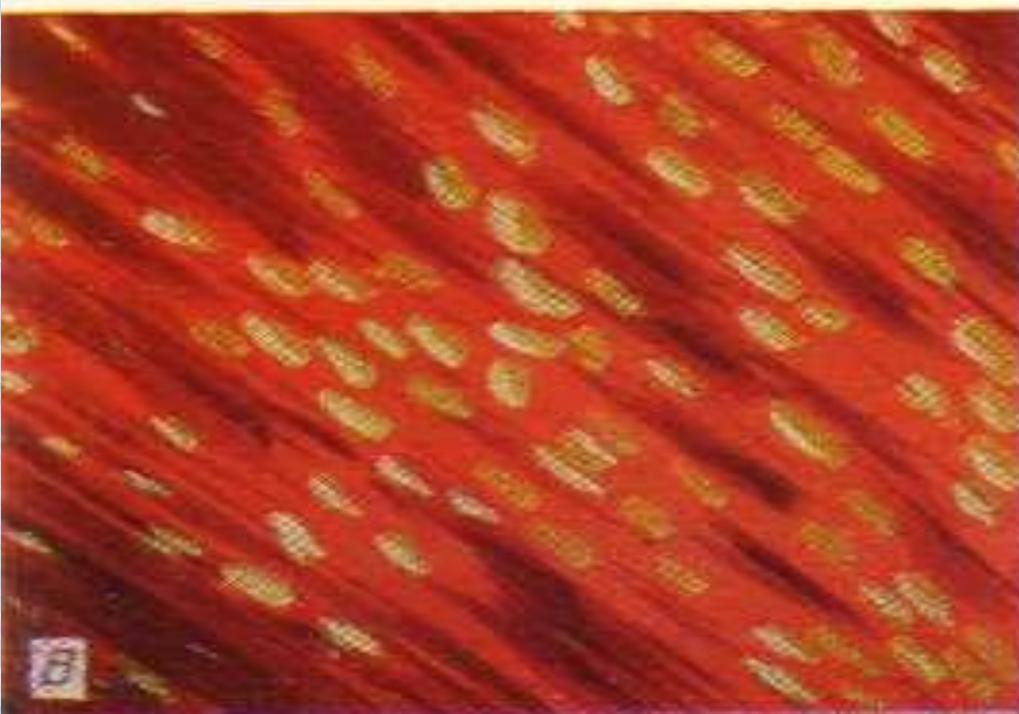
48-72 часов после заражения



«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». Метод «бляшек» используют для дифференциации вирусов и определения их концентрации.

Реакции гемадсорбции и гемагглютинации основаны на способности некоторых вирусов вызывать агглютинацию (склеивание) эритроцитов за счёт вирусных гликопротеиновых шипов - гемагглютининов.

«Цветная» реакция оценивается по изменению цвета индикатора в питательной среде культивирования. Если вирусы не реплицируются в культуре клеток, живые клетки в процессе метаболизма выделяют кислые продукты, что ведет к изменению pH среды и, соответственно, цвета среды. При репродукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается (клетки гибнут), и среда сохраняет свой первоначальный цвет.



Образование
симпластов в
культурах клеток
под влиянием
вирусов кори и
паротита. А -
интактная
культура клеток
почки морской
свинки; Б -
симпласт в той
же культуре
клеток,
инфицированной
вирусом кори; В -
интактная
культура
фибробластов
куриного
эмбриона; Г -
симпласт в той
же культуре
клеток,
инфицированной
вирусом
паротита. Об. X
40, ок. X 5

Особенностью **серологического метода** в вирусологии является исследование парных сывороток. Первую сыворотку берут у больного в острый период в начале болезни, хранят при температуре $+4^{\circ}$ - $+8^{\circ}$ С, вторую сыворотку берут через 10-14 дней. Сыворотки исследуют одновременно. О болезни свидетельствует сероконверсия, то есть нарастание титра антител во второй сыворотке по отношению к первой.

Диагностической является **сероконверсия в 4 раза и выше**. Так как многие вирусные болезни протекают остро, этот вариант серологического метода обычно применяют для ретроспективной диагностики.

Прионы

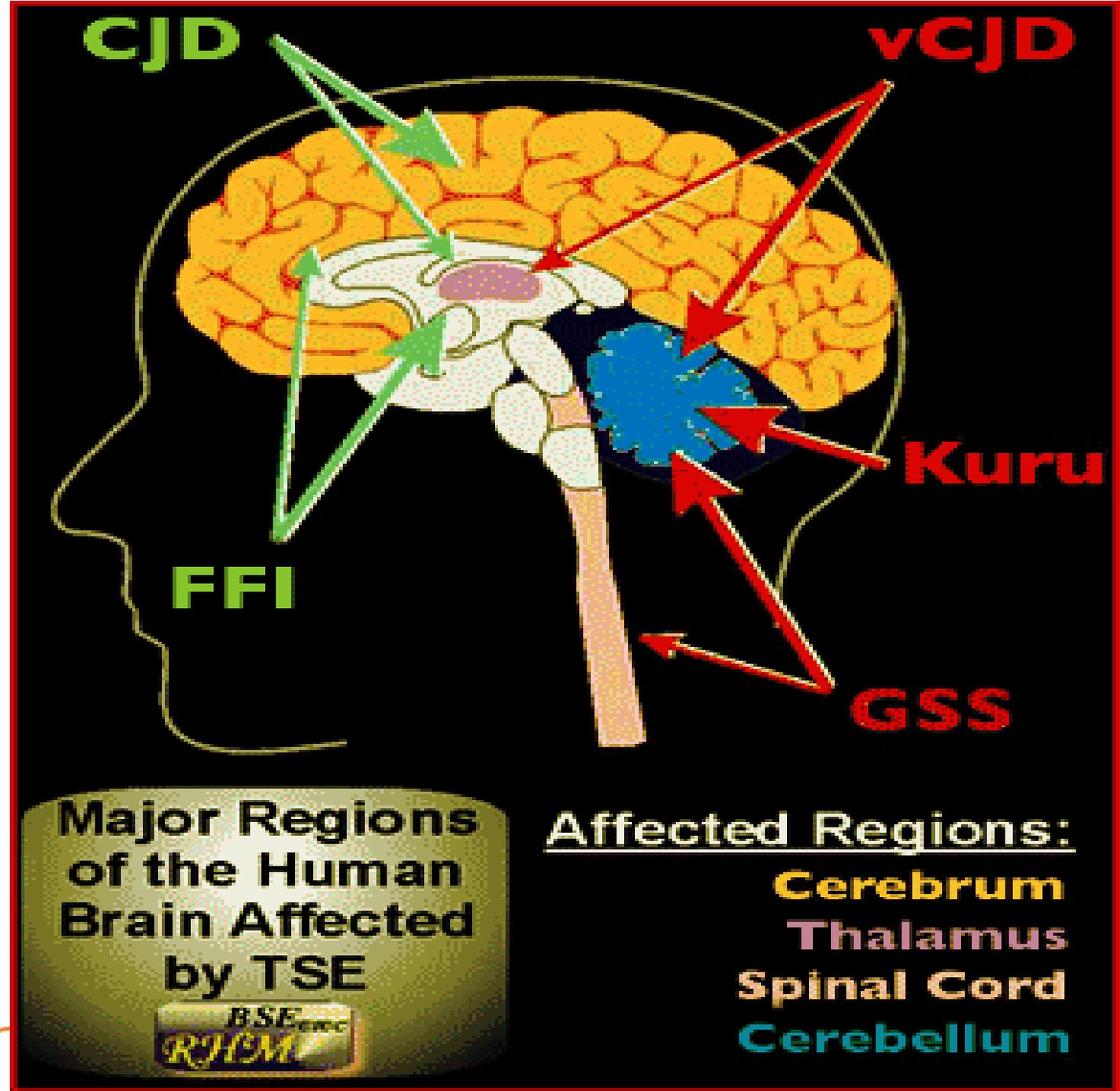
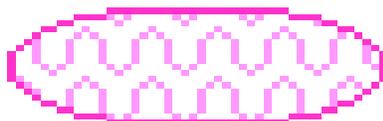
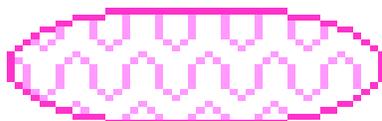
ПРИОНЫ – белковые инфекционные частицы

- Прионы – неканонические патогены, вызывающие трансмиссивные губкообразные энцефалопатии человека и животных.
- Прионный белок - PrP
- Две изоформы:
 - ❖ Клеточная (нормальная) PrP^c
 - ❖ Изменённая (патологическая) PrP^{sc}

Прионные инфекции

PrP^{Sc}

PrP^C



Прионные болезни

Человек	Куру Болезнь Крейцфельдта-Якоба Синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера Семейная фатальная бессонница Амиотрофический лейкоспонгиоз
Овцы, козы	Скрепи
Норки	Трансмиссивная энцефалопатия
Олени, лоси	Хроническая изнуряющая болезнь
Крупный рогатый скот	Губкообразная энцефалопатия
Кошки	Губкообразная энцефалопатия

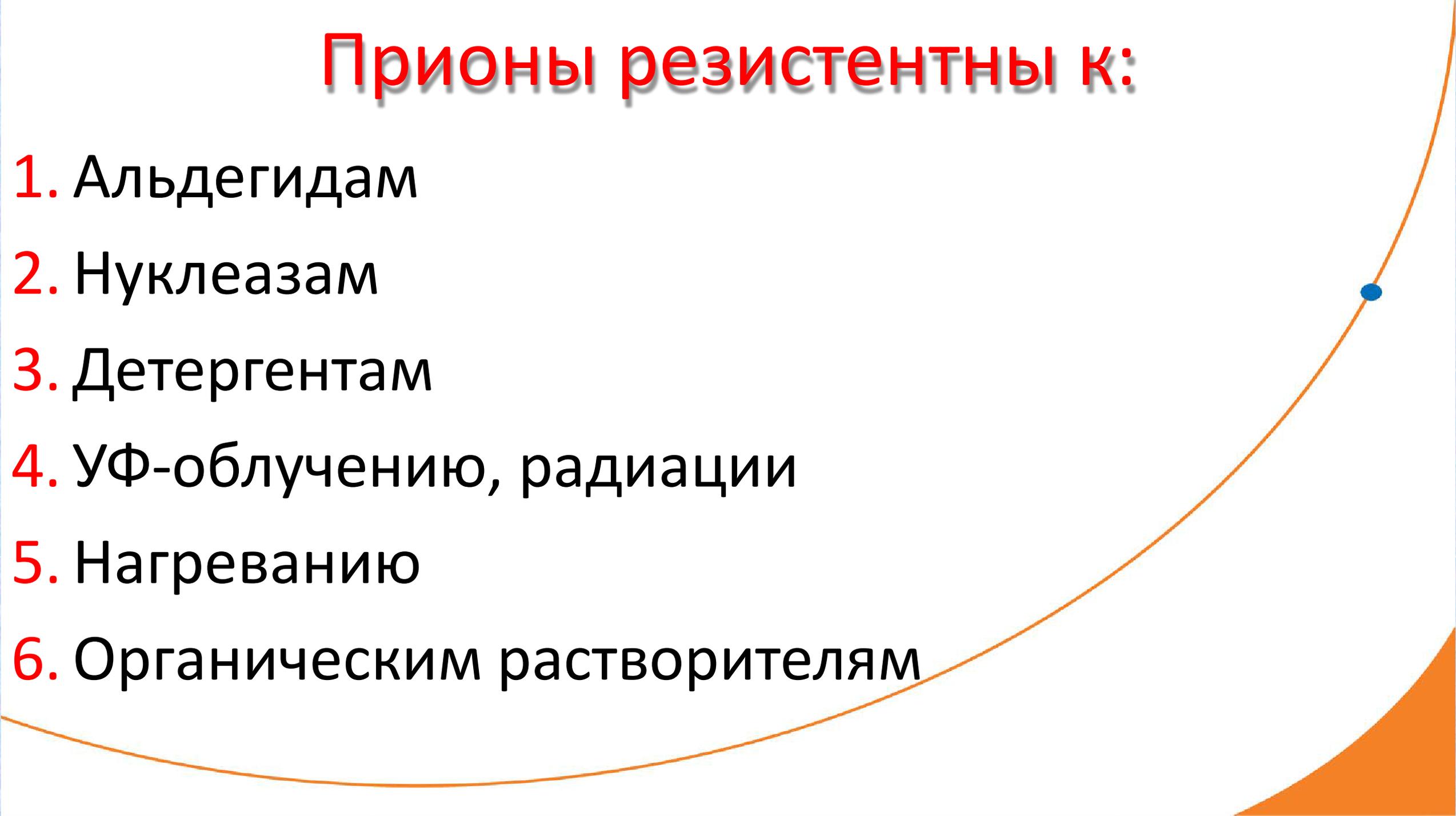
Прионы – характеристика белка

- PrP^c (cellular prion protein) 33 kd существует у живых организмов от нематод до человека
- Кодировается геном PrNP на 20 хромосоме
- Заякорен в мембрану нейрона
- Чувствителен к протеазе
- Компонент мембраны нейронов
- Регулирует передачу нервных импульсов
- Участвует в метаболизме меди в ЦНС

Прионы – характеристика белка

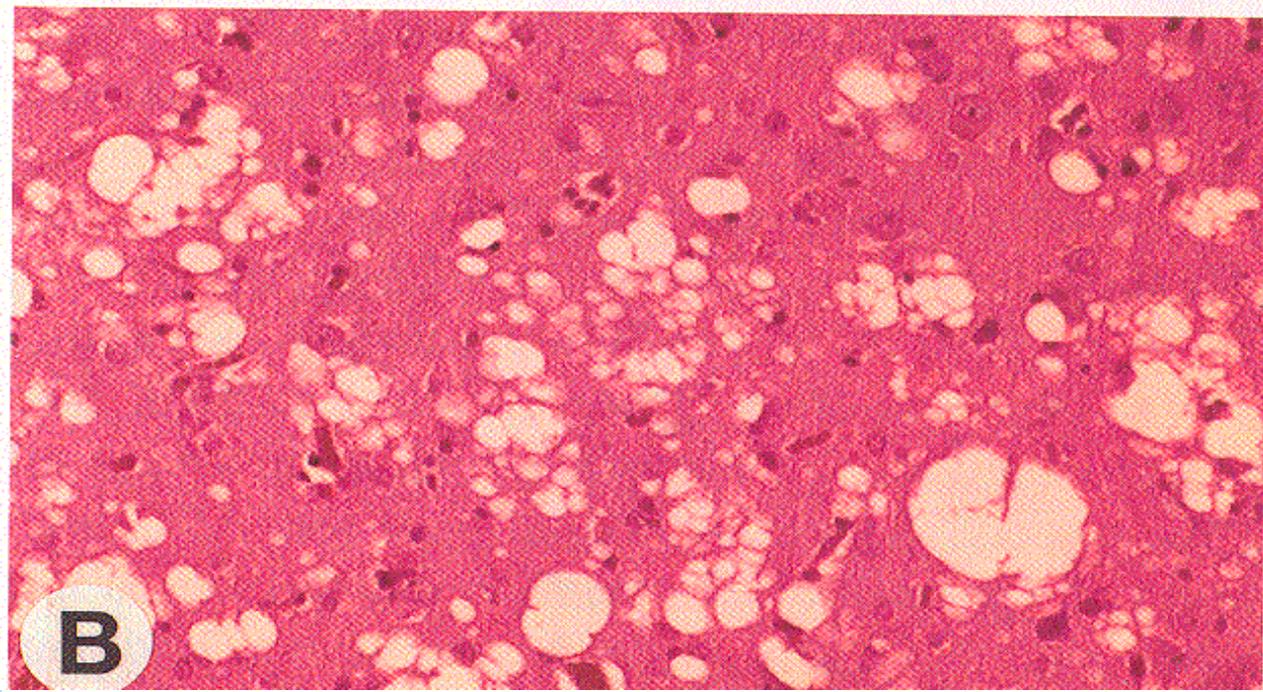
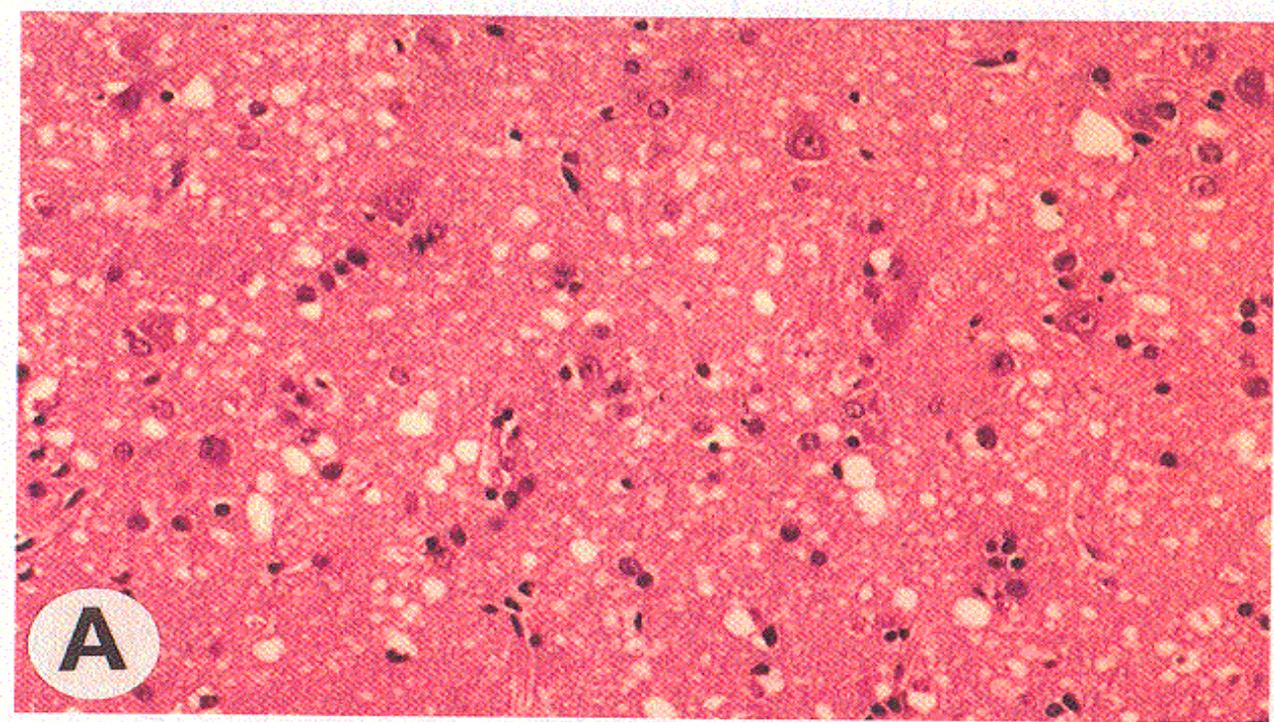
- PrPsc (scrapie prion protein) 27-30 kd
- Изоформы прионного белка
- Устойчивы к протеолизу и другим воздействиям
- Способность к агрегации в амилоидные фибриллы
- Накопление в плазматических везикулах
- 40% β -складчатых структур (вместо 3% у PrPc)

Прионы резистентны к:

1. Альдегидам
 2. Нуклеазам
 3. Детергентам
 4. УФ-облучению, радиации
 5. Нагреванию
 6. Органическим растворителям
- 

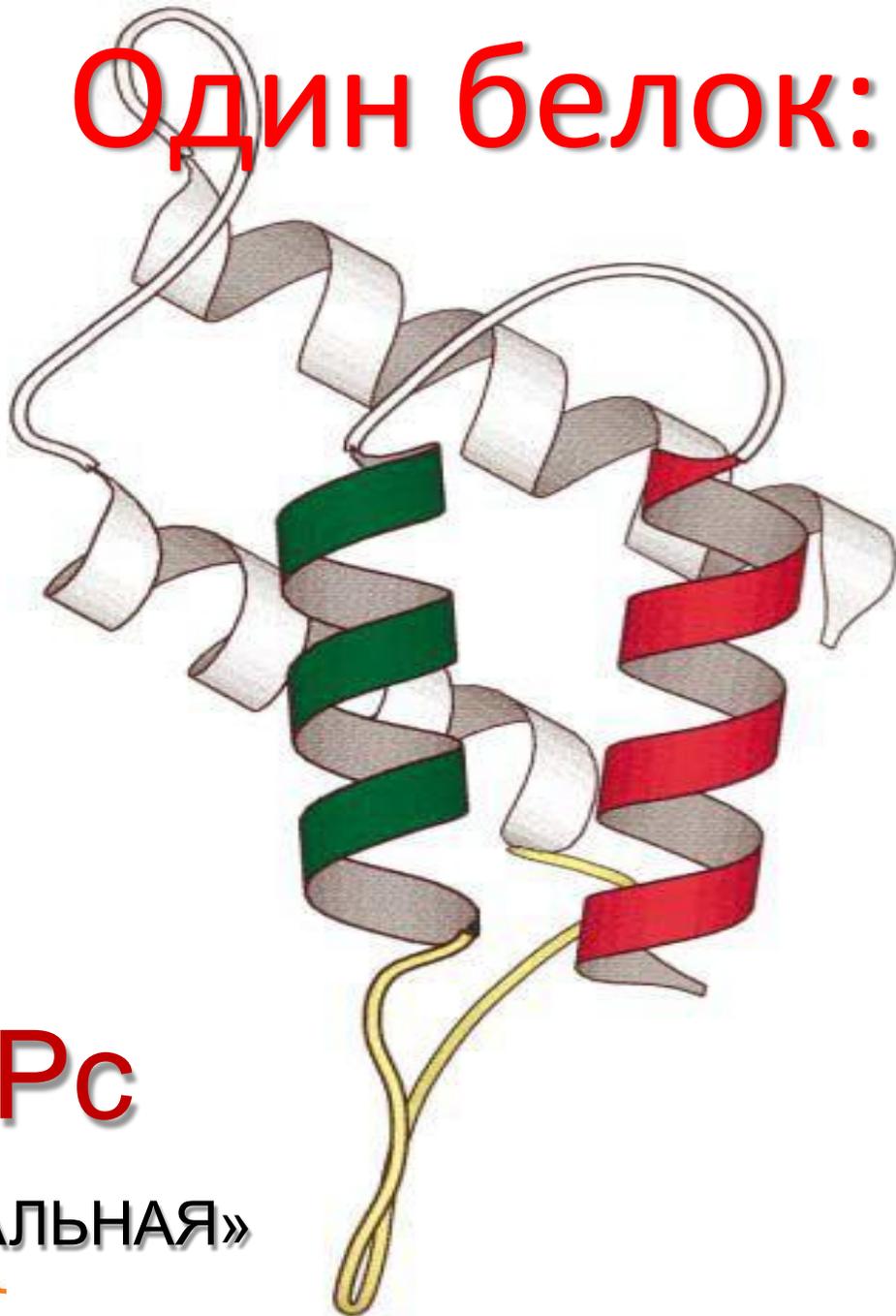
Прионы – патогенез заболевания

- Появление аномальных изоформ
- Нарушение посттрансляционного созревания (присоединение гликолипида)
- Концентрация белка вместо мембраны в цитоплазме и аппарате Гольджи



Гистология при прионной инфекции

Один белок: две структуры

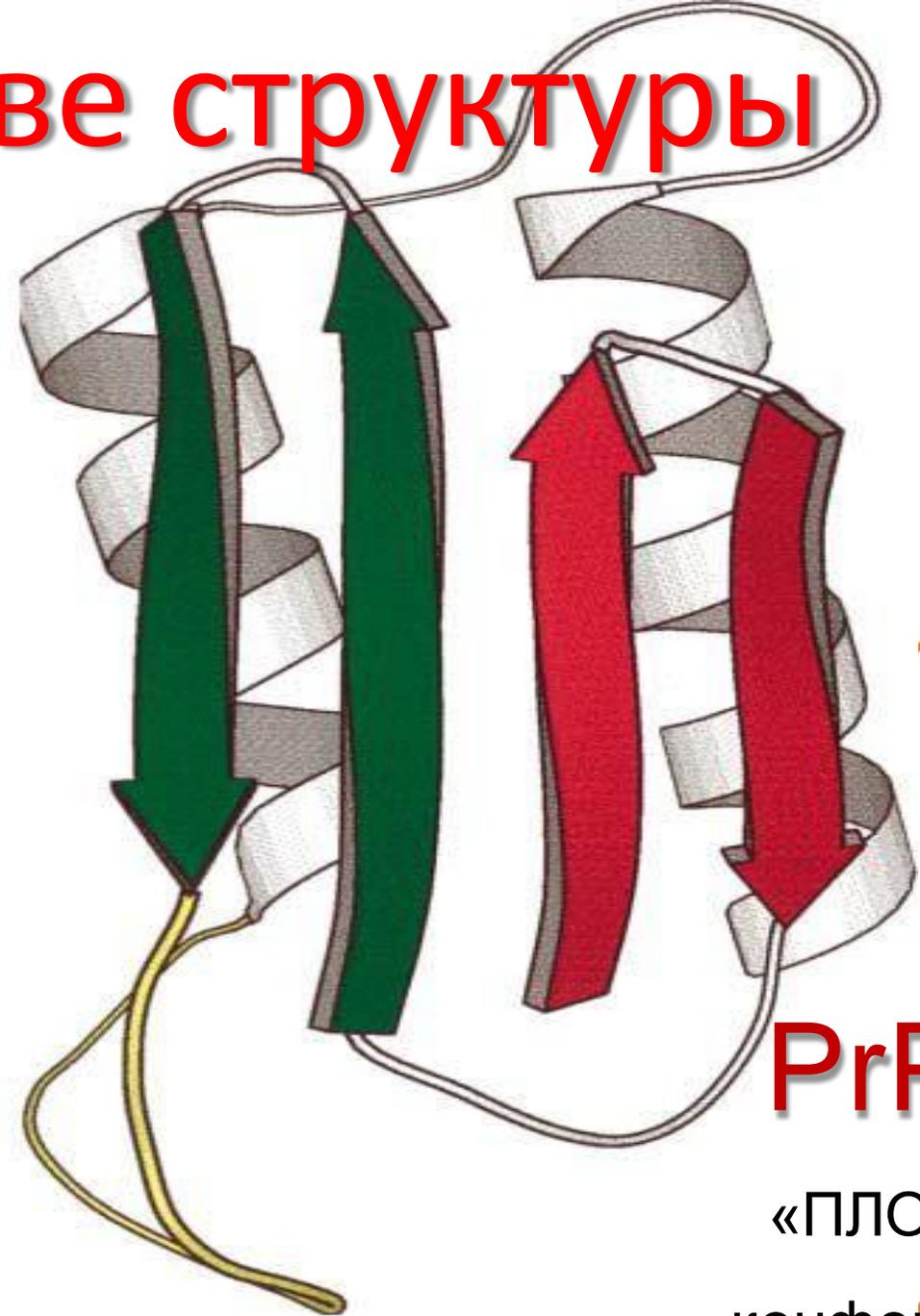


PrPc

«НОРМАЛЬНАЯ»

конформация

(a)



PrPsc

«ПЛОХАЯ»

конформация

(b)

Прионы – патогенез заболевания

Молекула шаперона - молекула белка, принимающая участие в изменении структуры других молекул.

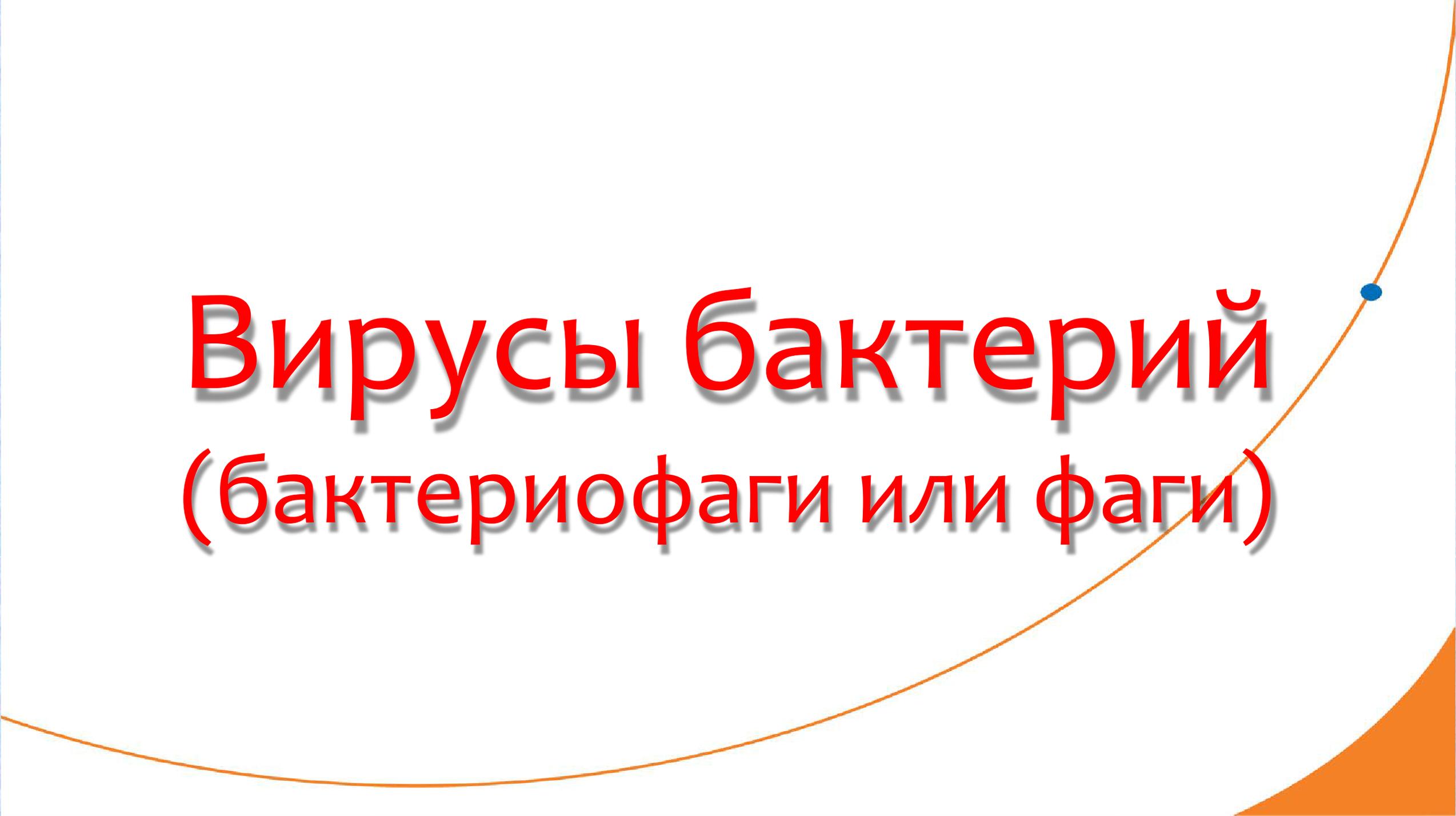
Шапероны могут управлять собственным скручиванием. ●

Прионы – аутошапероны (имеют гомологию с другими шаперонами)

Биологическая информация может передаваться непосредственно белками без нуклеиновых кислот

Недостаточное скручивание PrP^c можно рассматривать как структурную мутацию, в клетках мишенях. Этот процесс необратим.

Вирусы бактерий (бактериофаги или фаги)

A decorative orange arc curves across the bottom of the slide, starting from the left edge and ending at the right edge. A small blue dot is positioned on the arc, approximately one-third of the way from the right edge.

Феликс Хьюберт Д'Эрель

1873-1949

В 1917 г. наблюдал лизис бактериальной культуры шигелл вирусами бактерий - бактериофагами («пожиратель» бактерий - от лат. *phagos* - пожирающий)



Бактериофаги

Фаги - вирусы бактерий («пожиратель» бактерий - от лат. *phagos* - пожирающий).

- Номенклатура основана на видовом наименовании хозяина. Например, фаги, лизирующие возбудителя дизентерии (шигелл), получили название дизентерийных бактериофагов.
- Фаги способствуют изучению молекулярной генетики и общей вирусологии: простота культивирования, короткий период генерации, высокий выход фагового потомства, возможность количественного учёта.
- Структура. Имеют сперматозоидную форму. Состоят из головки, которая содержит нуклеиновую кислоту и отростка. Размеры фаговой частицы колеблются от 20 до 200 нм.
- Химический состав. Фаги состоят из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и белка. Большинство из них содержат двунитевую ДНК в виде кольца. Реже - однонитевые фаги.

Строение бактериофагов

ГОЛОВКА

НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА
(ДНК или РНК)

БЕЛКОВАЯ
ОБОЛОЧКА

ВНУТРЕННИЙ
СТЕРЖЕНЬ

ХВОСТОВОЙ
ОТРОСТОК

СОКРАТИТЕЛЬНЫЙ
ЧЕХОЛ

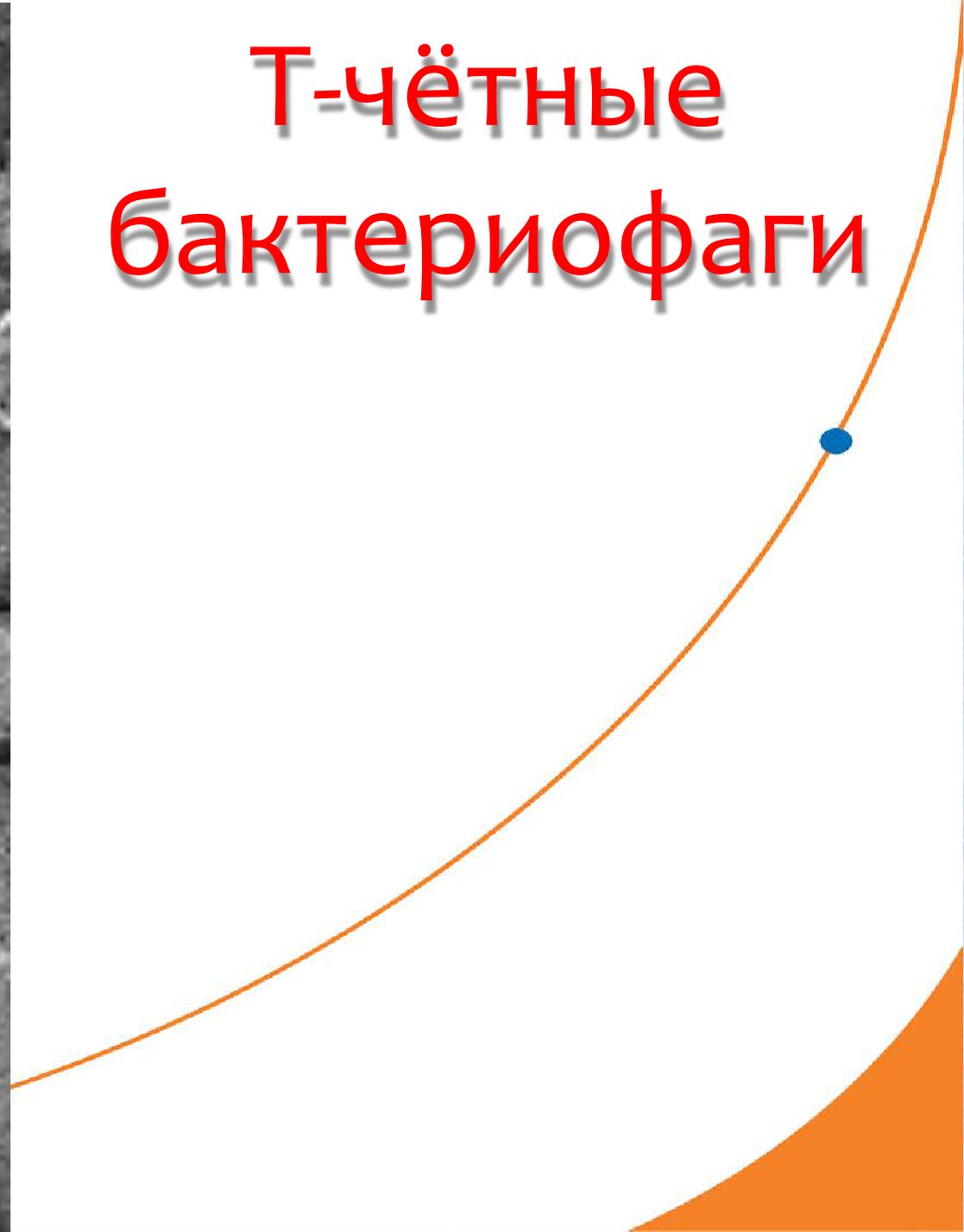
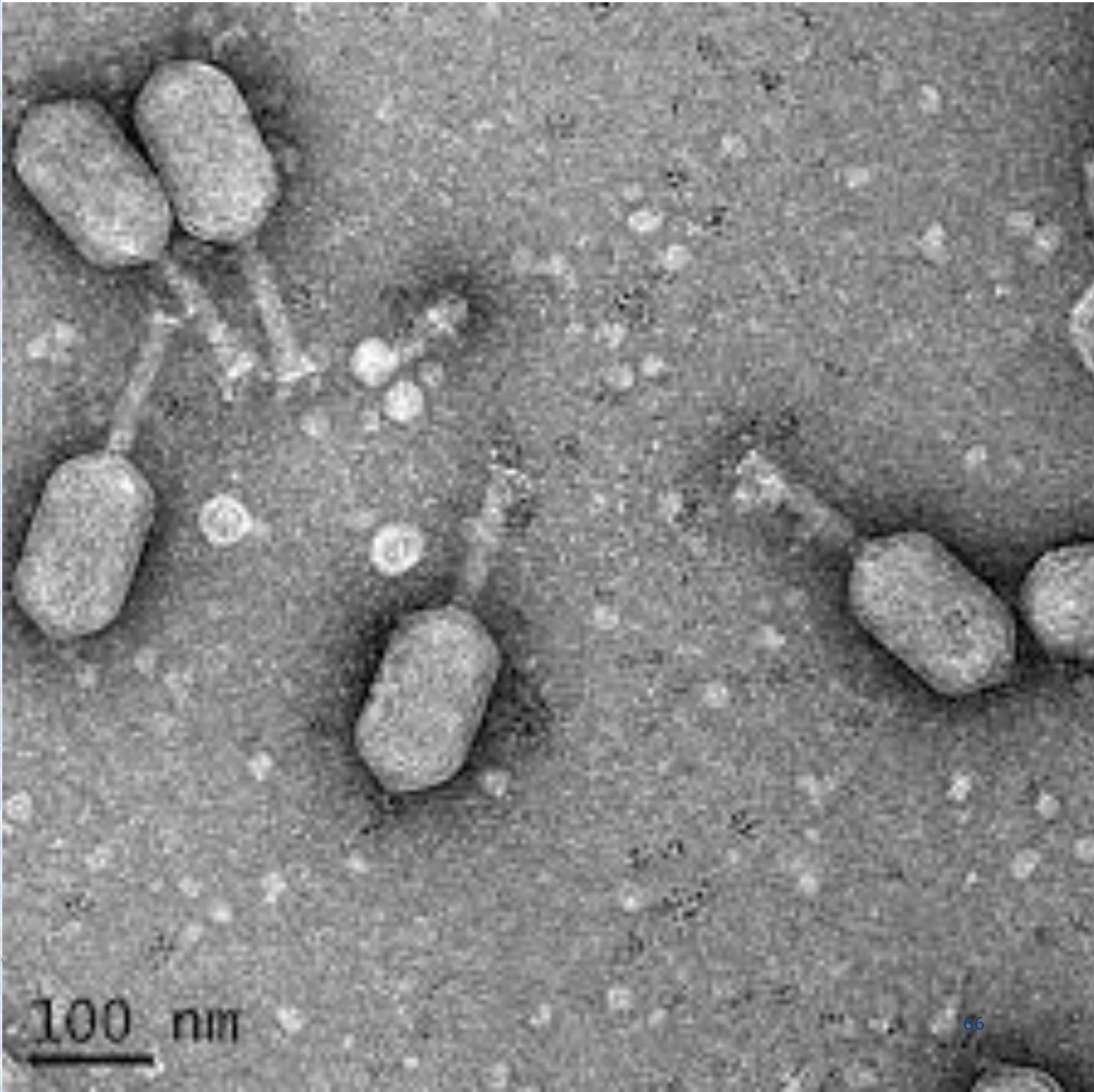
БАЗАЛЬНАЯ
ПЛАСТИНКА

ФИБРИЛЛЫ

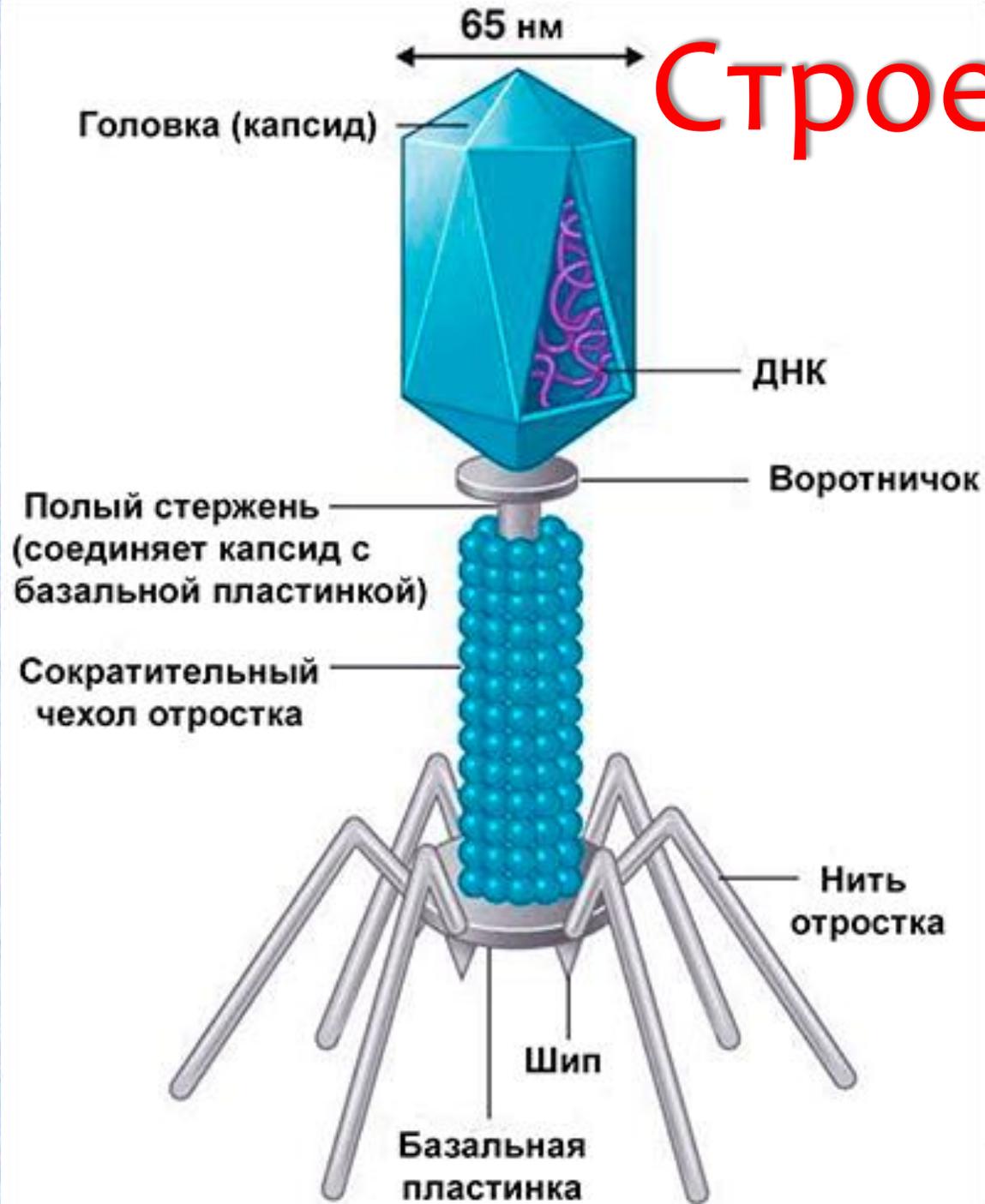
- 1. Геном** (чаще – двуцепочечная ДНК или одноцепочечная РНК). Ферменты: репликации, транскрипции, участвующие в проникновении НК в клетку и выходе бактериофагов из клетки хозяина (нейраминидаза, лизоцим, АТФ-аза)
- 2. Капсид** (белковая оболочка) состоит из капсомеров. Спиральный и кубический тип упаковки капсомеров. Икосаэдры.



T-чётные бактериофаги



Строение бактериофагов



Наиболее сложная структура Т-чётных фагов (Т₂), состоящих из головки гексагональной формы и отростка, который образован полым стержнем. Снаружи стержень окружен чехлом, способным к сокращению. На дистальном конце отростка имеется шестиугольная базальная пластинка, в углах которой располагаются короткие зубцы. От каждого зубца отходит по одной нити длиной 150 нм. Базальная пластинка и нити осуществляют процесс адсорбции фага на бактериальной клетке. Капсид головки фага и чехол отростка построены из полипептидных субъединиц по кубическому (головка) и спиральному (отросток) типу симметрии. Под чехлом дистальной части отростка содержится фермент лизоцим.

Стадии взаимодействия фагов и бактерий на примере продуктивного процесса (вирулентные фаги)

Адсорбция фага на бактериальной клетке происходит при соответствии фаговых рецепторов с рецепторами клеточной стенки. Некоторые фаги адсорбируются на половых ворсинках (sex pili), контролируемых F- или R-плазмидами.

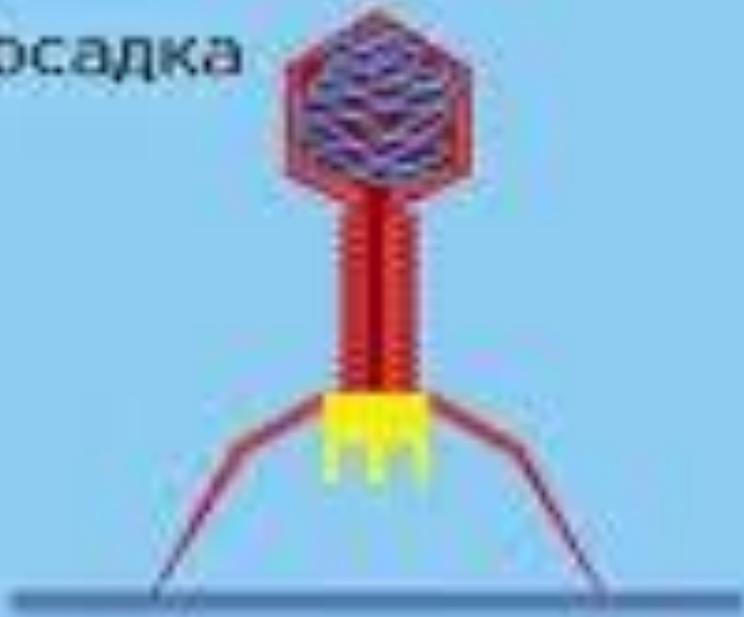
Внедрение фаговой НК (инъекция фага).

Репродукция фага - репликация фаговой нуклеиновой кислоты и синтез фагоспецифических ферментов транскрипции и репликации происходят как и при репродукции других вирусов. Однако время для формирования фагового потомства короче.

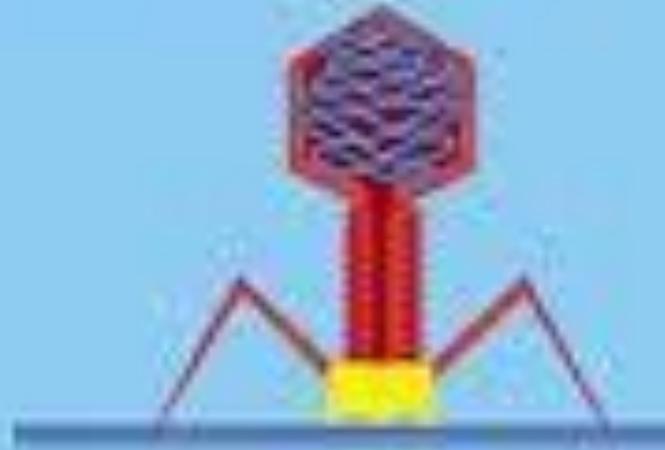
Сборка фаговых частиц заключается в заполнении фаговой ДНК пустотелых капсид головки.

Выход зрелых фагов из бактериальной клетки происходит путём «взрыва», во время которого бактерии лизируются. Лизис происходит при участии фагового лизоцима либо без него.

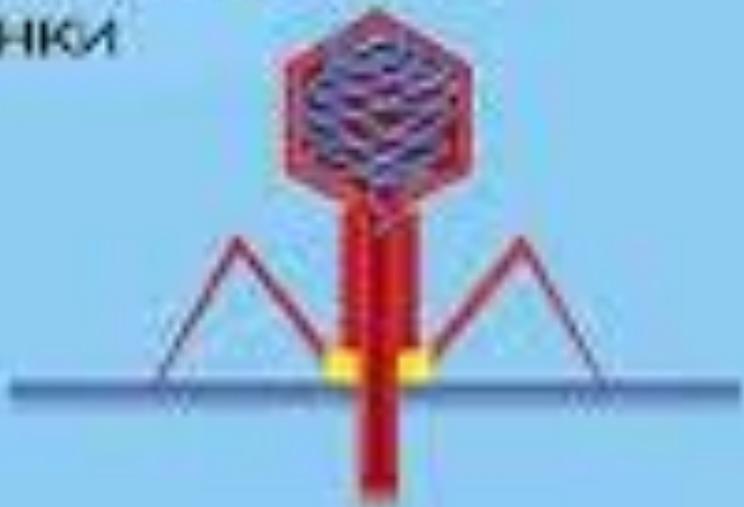
Посадка



Фиксация



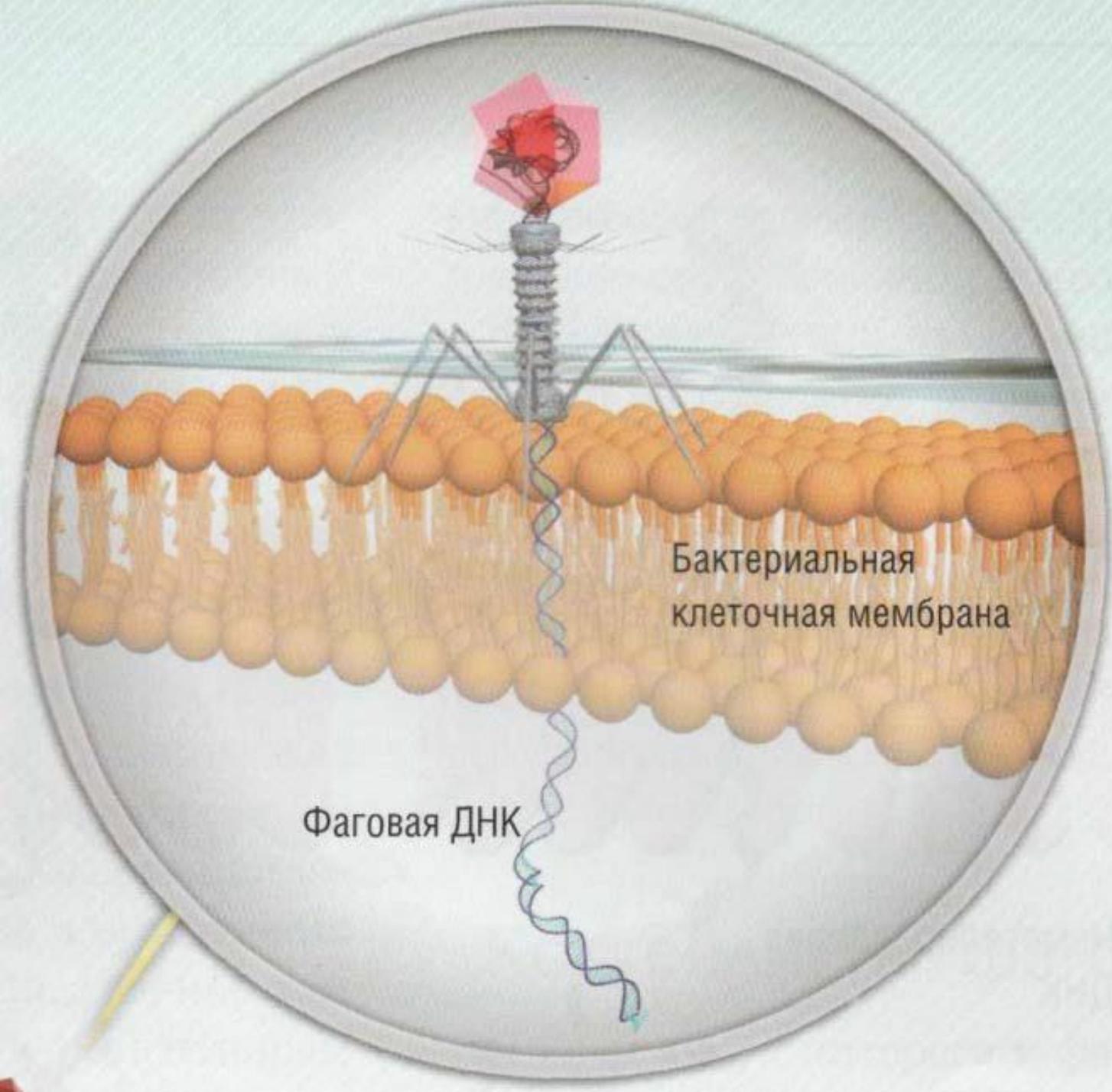
Прокол
клеточной
стенки



Инъекция ДНК



Взаимодействие
вирулентных
фагов и
бактерий при
продуктивной
инфекции



Инъекция ДНК
вирулентного
бактериофага в
бактериальную
клетку

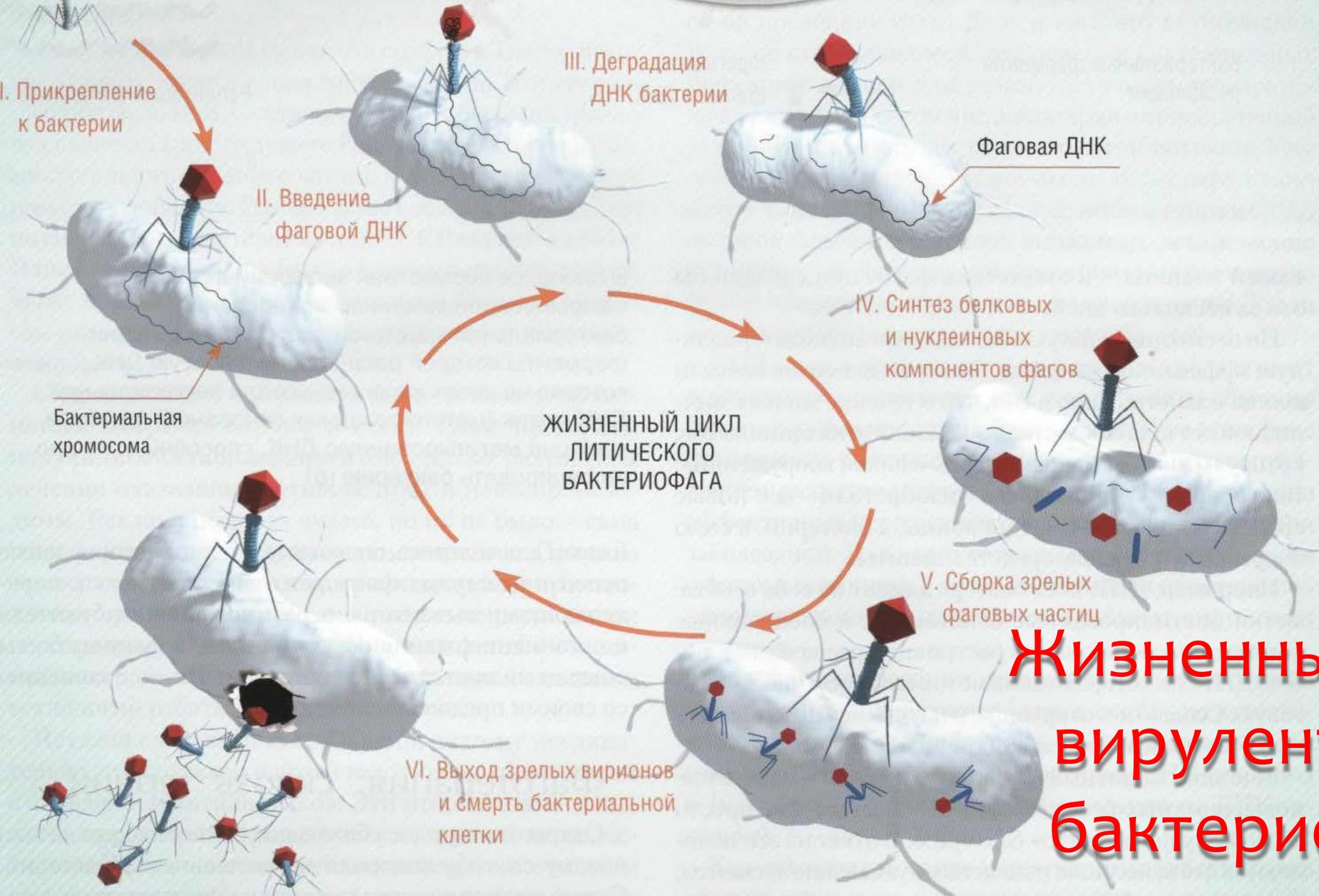
Основные свойства фагов

Различают **вирулентные** (продуктивный, литический процесс) и **умеренные** (интегративный процесс, лизогения) фаги.

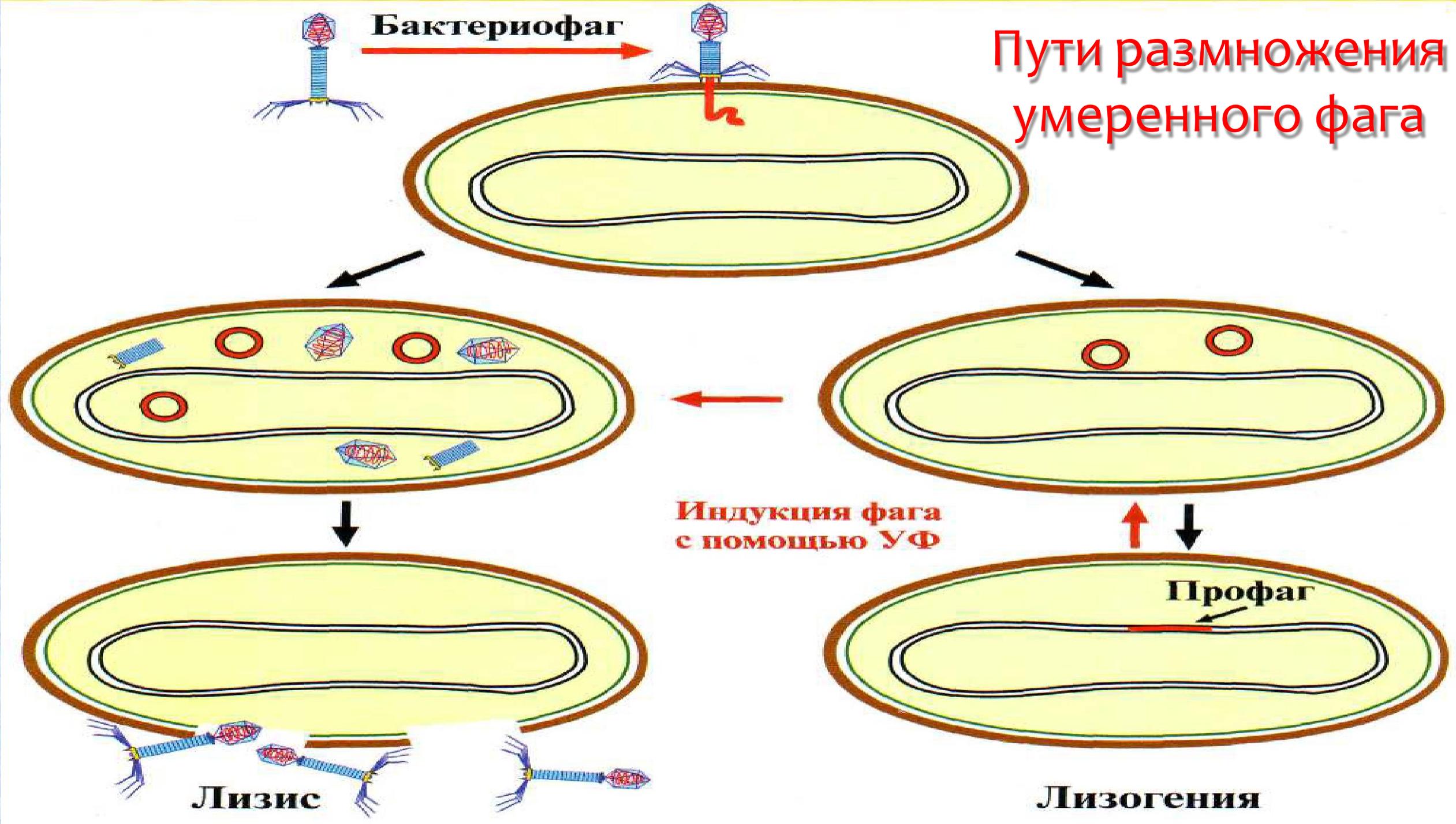
Фаги, вызывающие интегративный тип инфекции, получили название умеренных. Они отличаются от вирулентных тем, что встраивают свою ДНК в бактериальный геном, с которым реплицируются. Фаговая ДНК, интегрированная с геномом хозяина, носит название **профага**.

Бактериальные клетки, содержащие профаг, называются **лизогенными**, а само явление **лизогенией**. Это название отражает потенциальную способность лизогенных бактерий к лизису при освобождении профага из состава бактериального генома и перехода в вирулентный фаг, способный репродуцироваться.

Лизогения лежит в основе **фаговой** или **лизогенной конверсии**. Она заключается в изменении свойств лизогенных бактерий, например приобретении способности продуцировать токсин. Механизм этого явления связан с внесением новой генетической информации в бактериальную клетку (**трансдукцией**).



Жизненный цикл вирулентного бактериофага



Умеренные и дефектные фаги

Факторами изменчивости бактерий могут быть умеренные или дефектные фаги, которые напоминают по своим свойствам плазмиды бактерий. Встраиваясь в хромосому, они вызывают лизогенизацию бактерий, которые могут приобретать новые признаки.

Изменчивость лизогенных бактерий связана с приобретением генов, переносимых данными фагами от их предыдущих хозяев (**бактерий-доноров**) или с экспрессией «молчащих» генов бактерий-реципиентов.

В последнем случае фаговая ДНК, встраиваясь вблизи повреждённого промотора, заменяет его. При этом синтезируются определённые продукты, например, протоксины коринебактерий, дифтерии, клостридий.

Кодируемые фагами факторы патогенности бактерий

Бактериофаг	Бактерия-хозяин	Фактор патогенности	Ген	Функция
β-фаг	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	дифтерийный токсин	<i>tox</i>	экзотоксин
Фаг C1	<i>Clostridium botulinum</i>	нейротоксин	<i>C1</i>	экзотоксин
Фаг СТХφ	<i>Vibrio cholerae</i>	холерный токсин А, В	<i>ctxAB</i>	экзотоксин
Фаг лямбда	<i>Escherichia coli</i>	белок наружной мембраны Lom	<i>Lom</i>	адгезин
Фаг φC3208	<i>Escherichia coli</i>	гемолизин	<i>hly2</i> <i>stx2AB</i>	экзотоксин
Фаг φETA	<i>Staphylococcus aureus</i>	эксфолиатин А	<i>eta</i>	экзотоксин
Фаг H4489A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	гиалуронидаза	<i>hylP</i>	инвазин
Фаг SopEφ	<i>Salmonella typhimurium</i>	эффектор III типа секреторной системы	<i>sopE</i>	инвазин

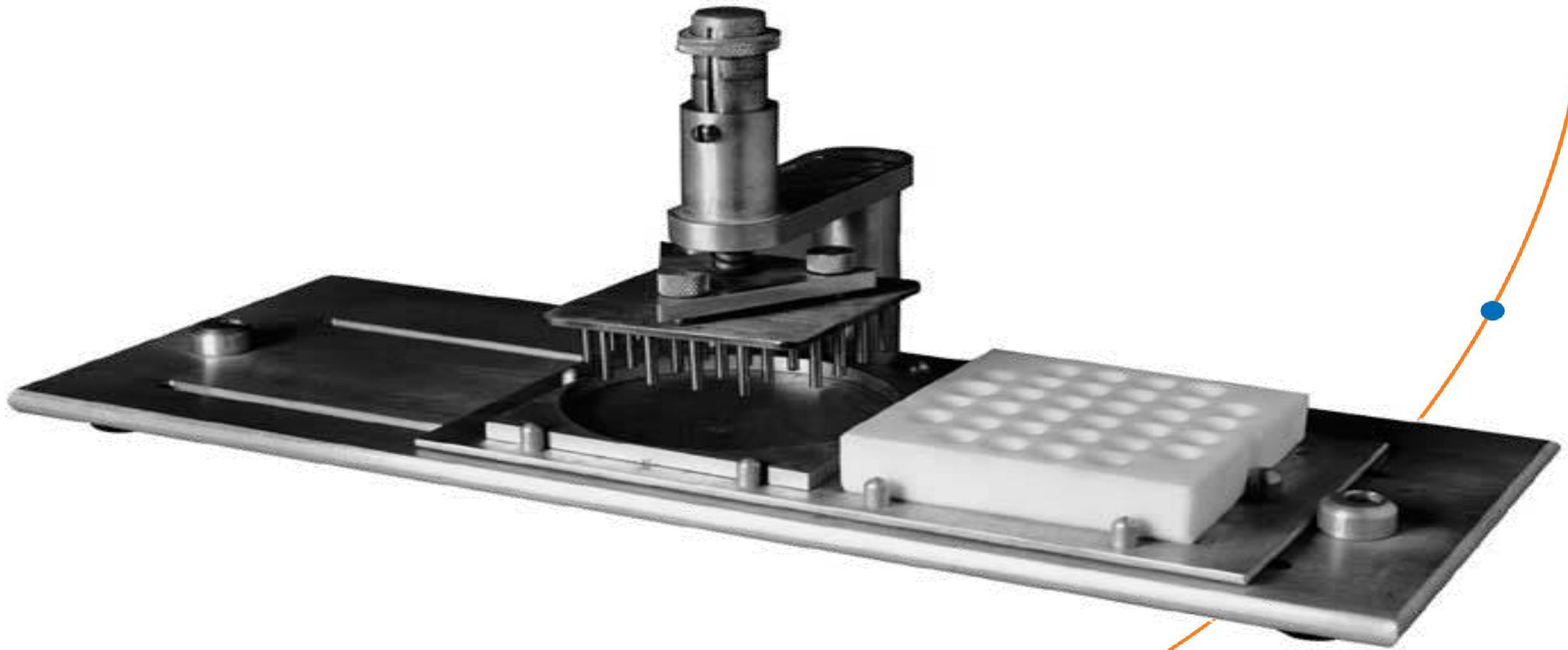
Практическое применение бактериофагов

Специфичность бактериофагов используется для:

- **идентификации** (определения вида и фаговара),
- для оценки санитарного состояния окружающей среды и эпидемиологического анализа,
- для **фагопрофилактики** (купирование вспышек) и **фаготерапии** (лечение дисбактериозов).

Метод фаготипирования бактерий позволяет не только определить видовую принадлежность культуры, но и её **фаговар**. Это связано с тем, что у бактерий одного и того же вида имеются рецепторы, адсорбирующие строго определённые фаги, которые затем вызывают их лизис. Использование наборов специфических фагов позволяет проводить фаготипирование культур.

- ❖ По наличию фагов во внешней среде (**водоёмах**) можно судить о содержании соответствующих бактерий. Данный метод индикации патогенных бактерий применяется на практике. Его эффективность повышается при постановке реакции нарастания титра фага, которая основана на способности специфических фагов репродуцироваться на определённых бактериальных культурах. При внесении такого фага в исследуемый материал, содержащий искомый возбудитель, происходит нарастание его титра.
- ❖ Для выявления фагов используют спот-тест (**негативное пятно при росте колоний на плотной среде**) или метод агаровых слоёв (**титрование по Грациа**).



Устройство для фаготипирования

Phage type 52-52a-80

	90		92	
29	52	52a	79	80
3a	3c	55	71	187
6	42e	47	53	54
75	77	83a	84	85
95	96	88	81	42d



Проводится с помощью набора типовых фагов: на чистую культуру наносится 23 фага штампом-репликатором, результат 4+/3+/2+ считается сильным (номера указываются), +/- считается слабым (номера не указываются в ответе)

Внутривидовое типирование *S. aureus*

Направления применения бактериофагов

Бактериофаг-опосредованный биоконтроль	Мероприятия по уничтожению бактерий, поражающих сельскохозяйственные растения и животных на этапе, предшествующем их попаданию на перерабатывающие заводы
Фаговый биопроцессинг	Деконтаминация и продление срока годности овощей, фруктов, мяса, рыбы и т. д. в процессе их заводской переработки перед упаковкой полуфабрикатов и готовой к употреблению продукции
Фагопрофилактика	Профилактическое применение пероральных специализированных продуктов на основе бактериофагов для снижения риска развития спорадических случаев и эпидемических вспышек ОКИ и ИСМП
Фаготерапия	Индивидуальный подбор штаммового состава бактериофагов с учётом быстрого изменения циркулирующих штаммов-возбудителей и формирования антифагового иммунитета, создание новых лекарственных форм и методов лечения.
Фагокосметика	Использование бактериофагов для создания косметических средств и средств личной гигиены
Фаг-опосредованная биодезинфекция	Дезинфекция помещений и инструмента ЛПУ и пищевых производств средствами на основе фагов.
Фагодиагностика	Индикация и идентификация микроорганизмов с помощью фаговых диагностикумов
Фаговый дисплей и транспорт лекарств	Экспонирование, отбор, доставка молекул с заданными свойствами (АТ, вакцина и др.) в организме



**Основоположник
отечественной фаготерапии
Элиава Георгий Григорьевич
1892-1937**

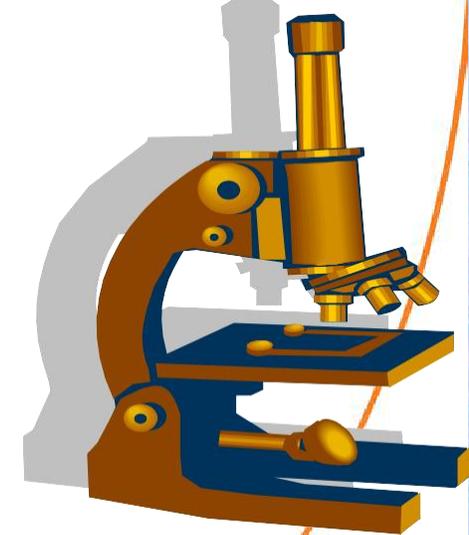
Достоинства бактериофагов

- Специфичность действия
- Не вызывают дисбиоз
- Не токсичны
- Не реактогенны
- Способствуют нормализации иммунных показателей
- Совместимы с любыми лекарственными средствами
- Эффективность на уровне современных антибиотиков
- Самоэлиминация из организма



Лауреат Нобелевской премии
2008 года по физиологии и
медицине Харальд Цурхаузен
(Harald zur Hausen)

Премия получена за
доказательство онкогенной
природы папилломавирусов и
создание первой
профилактической вакцины от
кондиломатозов и рака шейки
матки.



Благодарю за внимание

Москва



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра Клинической лабораторной
диагностики и патологической
анатомии

 **Денисова**
 **Ольга**
 **Владимировна**

 **Телефон +7-985-644-**
 **80-90 (в том числе**
вотсап)

 **[email.com](mailto:denisova_ov@inbox.ru)**
denisova_ov@inbox.r
u