***Занятие 13***

**Культивирование вирусов, риккетсий и хламидий. Методы индикации и идентификации вирусов. Фаги, получение, титрование и применение бактериофагов.**

**Вирусы, риккетсии и хламидии – как облигатные внутриклеточные паразиты.**

* Вирусы, риккетсии и хламидии являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами размножаются только внутри клетки хозяина и не культивируются на искусственных питательных средах
* **Размножение риккетсий** происходит путем бинарного деления внутри клетки хозяина ( в ядре и цитоплазме)
* **Размножение хламидий** происходит внутри клетки хозяина и характеризуется уникальным циклом развития
* **Размножение вирусов** внутри клетки хозяина происходит путем репродукции.

**Репродукция вирусов.** При проникновении вируса в организм, он размножается не во всех клетках, а только внутри чувствительных к каждому типу вируса клеток. Взаимодействие вирусов с чувствительными клетками происходит в несколько этапов

**Этапы репродукции:**

* **Адсорбция вириона**
* **Проникновение вириона внутрь клетки хозяина** (*эндоцитоз-виропексис, слияние мембраны клетки с оболочкой вириона*)
* **«Раздевание», депротеинизация вириона**
* **Репликация вирусных нуклеиновых кислот и синтез вирусных белков**
* **Формирование вириона**
* **Выход вириона из клетки** ( *лизис клетки хозяина, «почкование»)*

**Особенности репродукции ДНК- и РНК- содержащих вирусов.**

* ***ДНК*-содержащие:**

 вирусная ДНК иРНК синтез вирусных белков

* **Плюс-нитевые *РНК*-содержащие вирусы**:

 вирусная РНК - синтез вирусных белков

* **Минус-нитевые *РНК*-содержащие вирусы** :

 вирусная РНК - иРНК - синтез вирусных белков

* **Ретровирусы**:

 вирусная РНК - комплементарная ДНК - иРНК - синтез вирусных белков

 **Типы взаимодействия вирусов с клеткой хозяина.**

* **Продуктивная инфекция**- репродукция
* **Абортивная инфекция**– частичная репродукция
* **Интегративная инфекция**– интеграция (вирогения)

**Основные принципы культивирования вирусов.**

* **В организме лабораторных животных**
* **В куриных эмбрионах**
* **В клеточных (тканевых) культурах**

**Культивирование вирусов в организме лабораторных животных.**

При вирусологических исследованиях с этой целью используют новорожденные ***лабораторные животные*** (белые мыши, крысы, кролики, обезьяны и др.). При заражении лабораторных животных различными способами (подкожно, внутримышечно, внутривенно, интраназально, внутрибрюшинно и т.д.) необходимо учитывать тропизм вирусов. Использование лабораторных животных в настоящее время весьма ограничено из-за видовой невосприимчивости животных к вирусам человека, контаминации животных посторонними микробами, а также по экономическим и этическим соображениям.

**Культивирование вирусов в куриных эмбрионах.**

***Куриные эмбрионы*** являются благоприятной моделью для культивирования вирусов из за возможности накопления в них большого количества вирусов, стерильности и доступной техники работы с ними и др. Обычно используют 6-12 дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ). Однако возможна контаминация куриных эмбрионов латентной вирусной или бактериальной инфекцией.

**Заражение куриных эмбрионов.**

* Выбирают выдержанные в холодильнике не более 10 дней оплодотворенные яйца с не пигментированной и чистой скорлупой (мыть нельзя). Определяют жизнеспособность зародыша овоскопированием; живой эмбрион подвижен, видна пульсация сердца.
* Куриные эмбрионы заражают в асептических условиях. Перед заражением скорлупу эмбрионов обрабатывают 70% этиловым спиртом, протирают йодом, а иногда еще и фламбируют.
* Выбор метода заражения определяется тропизмом вируса. Наиболее часто используют заражение в аллантоисную полость и на хорионаллантоисную оболочку, реже – в амниотическую полость и в желточный мешочек.
* В скорлупе выше границы (заранее очерченной карандашом) воздушной камеры делают отверстие диаметром около 1 мм. Инъецируют инфицирующую жидкость в объеме 0,1-0,2 мл, введением иглы на глубину не более 2-3.
* После инъекции вируссодержащего материала иглу извлекают, а отверстие в скорлупе закрывают каплей расплавленного парафина
* Вскрывают зараженный эмбрион через 48-72 ч инкубации, в период максимального накопления вирусов.

**Вскрытие зараженных эмбрионов.**

* Перед вскрытием скорлупу обрабатывают йодированным спиртом. Скорлупу срезают вышеобозначенных границ над воздушной камерой стерильными инструментами. При этом яйцо держат под некоторым углом, чтобы скорлупа не упала внутрь.
* После удаления скорлупы, осматривают ХАО приподнимая ее пинцетом, с целью установления в ней патологоанатомических изменений (геморрагии, белесые пятна). Часть ХАО, на которую был нанесен вируссодержащий материал, имеет обычно наиболее выраженные изменения.

**Методы индикации вирусов в зараженном курином эмбрионе.**

Показателем заражения эмбриона вирусом может служить:

* Гибель эмбриона
* Появление на хорионаллантоисной оболочке (ХАО) некротических участков, узелков (оспин).
* Реакция гемагглютинации с амниотической и аллантоисной жидкостью

**Исследование зараженной ХАО.**

* Для более тщательного осмотра ХАО приподнимают пинцетом и срезают ножницами.
* Для осмотра и взятия всей ХАО удаляют зародыш, желточный мешок и белок, а хорионаллантоисную оболочку отслаивают от внутренней поверхности скорлупы, извлекают и переносят в стерильную чашку Петри с физиологическим раствором. Оболочку отполаскивают, а затем двумя пинцетами расправляют так, чтобы она лежала в один слой и могла быть осмотрена по всей поверхности.
* Для того чтобы патологоанатомические изменения оболочки были видны более отчетливо, под чашку Петри подкладывают лист черной бумаги.

**Получение амниотической и аллантоисной жидкости.**

* Аллантоисную жидкость отсасывают пипеткой, которой прокалывают подскорлупную оболочку и ХАО. Ставят бактериологический контроль вируссодержащего материала посевом на МПБ, или сахарный бульон. Обнаружение вируса в материале проводят с помощью реакции гемагглютинации (РГА) и сохраняют в замороженном состоянии при -40C
* Взятие амниотической жидкости проводят после удаления аллантоисной жидкости. Для этого пипетку вводят в амнион между головой и телом зародыша и отсасывают пастеровской пипеткой.

**Реакции гемагглютинации с амниотической и алантоисной жидкостью.**

* Обнаружение вируса в аллантоисной и амниотической жидкостях зараженного эмбриона проводят постановкой ***реакции гемагглютинации.***
* Реакция основывается на способности антигенов некоторых вирусов ( гемагглютининов) агглютинировать (склеивать) эритроциты животных и используется при индикации вирусов

**Техника реакции гемагглютинации.**

* После вскрытия  амниотическую и  аллантоисную жидкость  разливают в пробирки или лунки плексигласовой пластины в объеме 0,5 мл (для контроля берут 0,5 мл такой же жидкости незараженного эмбриона).
* Затем добавляют по 0,2 мл 1% суспензии отмытых куриных эритроцитов и выдерживают при комнатной температуре.
* Результаты реакции учитывают через 40 мин после оседания эритроцитов; (++++) выраженная гемагглютинация — тонкая пленка из склеившихся эритроцитов на дне пробирки;
* (+++) – наличие просветов в пленке;
* (++) – наличие пленки из склеившихся эритроцитов с фестончатыми краями;
* (+) - хлопьевидный осадок эритроцитов, окруженный зоной комочков агглютинированных эритроцитов;
* - резко очерченный осадок эритроцитов неотличимый от контроля
* Наличие гемагглютинации в опытных пробирках при ее отсутствии в контрольных указывает на содержание вируса в исследуемой жидкости

**Реакция торможения гемагглютинации.**

* Используется при идентификации некоторых вирусов

 ( гриппа, кори, клещевого энцефалита и др.)

* Для определения вида вируса в исследуемом материале к нему добавляют сыворотку содержащую антитела к определенному виду вируса
* При наличии вируса в исследуемом материале, комплементарные к нему антитела инактивируют вирус и гемагглютинация эритроцитов не происходит

**Культивирование вирусов в культуре клеток (тканей).**

* Клеточная (тканевая) культура состоит из отдельных клеток органа или ткани, которые способны воспроизводить свои жизненно важные функции в питательных средах.
* Клетки, полученные из различных органов и тканей человека, животных, птиц и др. биологических объектов, размножают вне организма на искусственных питательных средах.

**Культивация вирусов в культуре клеток (тканей).**

* **Клеточные (тканевые) культуры:**
1. однослойные
2. суспензионные
3. органные
* **Однослойные культуры клеток**
1. Первичные культуры клеток
2. Перевиваемые (стабильные) культуры клеток
3. Полуперевиваемые культуры клеток

**Первичные культуры клеток.**

* Первичные культуры клеток получают путем обработки кусочков тканей животных или человека протеолитическими ферментами.
* Образующиеся путём дезинтеграции клетки оседают, прикрепляются и распластываются на поверхности стекла или пластика.
* После того, как первичная культура достигнет состояния монослоя, она может быть пересеяна или субкультивирована во второй культуральный сосуд трипсином или раствором Версена. Первичные культуры клеток способны размножаться ограниченное количество раз, и поэтому выдерживают не более 5-10 пассажей.

**Первичные культуры клеток.**

* Первичные культуры клеток получают из эмбриональной ткани человека или животных, так как именно эмбриональные клетки обладают высокой потенцией роста и размножения.
* Часто культуры клеток содержат смесь нескольких типов тканей, н-р, кожной, костной мышечной.
* По такому принципу изготавливают культуры фибробластов эмбриона человека(ФЭЧ) и фибробластов эмбриона кур (ФЭК), клетки почек человека (HEK) и т.д. При получении таких культур используют ткани эмбриона человека (после абортов) или 8-12-дневные куриные эмбрионы.
* Культивирование клеток проводится в стеклянной или пластиковой посуде со строгим соблюдением правил асептики

**Перевиваемые культуры клеток.**

* *Перевиваемые (стабильные) культуры клеток* способны размножаться неопределенно длительное время (десятки лет), т.е. выдерживают многочисленные пассажи
* Их получают главным образом из опухолевых или эмбриональных тканей обладающих большой потенцией роста
* Получены и наиболее широко в вирусологической практике применяются следующие линии перевиваемых клеток: (А-0, А-1, FL) – из культуры клеток амниона человека, HeLa —из карциномы шейки матки; Hep-2 — из карциномы гортани; Детройт-6 — из метастаза рака легкого в костный мозг; RD — из рабдомиосаркомы человека

**Диплоидная (полуперевиваемая) линия клеток.**

* *Диплоидная клеточная линия* -это клеточная линия, в которой более 75% клеток имеют кариотип нормальных клеток исходного вида.
* Многие из этих культур способны сохранять диплоидный набор хромосом даже после 50-80 и более пассажей
* Для получения диплоидной линии клеток используют фибробласты, выделенные из эмбриональной ткани человека и животных.

**Питательные среды, используемые для выращивания культур клеток консистенция.**

* Среды содержат полный набор аминокислот, витаминов и ростовые факторы.
* Наряду с сухими средами и готовыми компонентами выпускают готовые жидкие среды (199, Игла, гидролизат лактальбумина, сухие среды и концентраты)
* Среды подразделяют на ростовые и поддерживающие. Для выращивания клеточных культур применяются ростовые среды обогащенные сыворотками человека и животных (н-р, бычью сыворотку, эмбриональную телячью сыворотку и пр.) Содержание сыворотки в среде может составлять 2 - 30%
* В среды добавляют феноловый красный, который в кислой среде приобретает желто-оранжевый, а в щелочной - малиновый ( темно-красный) цвет.

**Методы индикации вирусов в культуре клеток.**

Размножение вирусов в культуре клеток не всегда сопровождается видимым эффектом. О репродукции вирусов в культуре клеток, зараженных вируссодержащим материалом можно судить на основании ***феноменов***

* Цитопатогенное действие (ЦПД), внутриклеточные включения (тельца), феномен гемадсорбции, «негативные колонии», «цветная проба». В процессе репродукции в культуре клеток некоторые вирусы оказывают *цитопатогенное действие (ЦПД),* то есть дегенерацию клеток. ЦПД проявляется вакуолизацией цитоплазмы клеток, разрушением митохондрий, округлением и гибелью клеток. Характер ЦПД позволяет использовать этот феномен для индикации и идентификации вирусов. ЦПД может отличаться у разных видов вируса

**Внутриклеточные включения.**

Некоторые вирусы можно обнаружить и идентифицировать повнутриклеточным включениям, которые образуются в ядре или цитоплазме зараженных клеток. Включения могут отличаться по величине (0,2-25 мкм), форме (округлые или неправильные) и численности. Они представляют собой скопления вирусных частиц, и выявляются при окраске по методу Гимзы или флюорохромами.

**«Цветная проба».**

* О репродукции вирусов в культуре клеток можно судить по ***«цветной реакции».*** Для этого используют культуры клеток, растущие на средах содержащих индикаторы (н-р, метиловый красный)
* При репродукции вирусов в культуре клеток нарушается их нормальный метаболизм (клетки погибают) и среда сохраняет первоначальный цвет.
* Если вирусы не размножаются в культуре клеток, то живые клетки выделяют кислые метаболиты, изменяющие рН и соответственно цвет индикатора в среде.

**Феномен гемадсорбции.**

* ***Феномен гемадсорбции*** еще один метод, используемый для индикации вирусов в культуре клеток. Феномен основан на способности культур клеток, инфицированных вирусами адсорбировать на своей поверхности эритроциты. Н-р, на поверхности парамиксо-, и ортомиксовирусов находятся гемагглютинины, способствующие гемадсорбции.
* Механизмы реакции гемадсорбции и гемагглютинации сходны.

**«Негативные колонии».**

* Размножение некоторых вирусов в культуре клеток приводит к гибели определенных участков и формированию ***«негативных колоний»,*** что также используют при индикации вирусов.
* Добавление агара в питательную среду ограничивает распространение вирусов по всему монослою клеток , в результате очаги некроза оказываются ограниченными друг от друга .
* Пораженные участки ( погибшие клетки) выглядят в виде светлых пятен на фоне окрашенного монослоя живых клеток.

**Феномен интерференции.**

* Для обнаружения вирусов, не дающих отчетливого ЦПД в культуре клеток используется ***феномен интерференции.*** Феномен интерференции - это явление когда клетка инфицированная одним вирусом становится устойчивой к заражению другим вирусом
* Например,  вирус краснухи размножается в ряде культур клеток без ЦПД и выявляется по феномену интерференции при заражении первичной культуры клеток другими цитопатогенными вирусами
* В качестве индуктора для суперинфекции используют вирус везикулярного стоматита, размножение которого в культуре клеток всегда сопровождается развитием ЦПД. Вследствие размножения вируса краснухи в культуре клеток, размножение вируса везикулярного стоматита не сопровождается видимым ЦПД, что свидетельствует о феномене интерференции. Если же вирус краснухи не размножается в культуре клеток, то размножение везикулярного стоматита в культуре клеток будет сопровождаться видимым ЦПД

**Реакция нейтрализации вирусов.**

* ***Реакция нейтрализации вирусов*** (биологической нейтрализации) используется при идентификации вирусов.
* Под действием нейтрализующих антител вирусы утрачивают способность вызывать заболевания у лабораторных животных, вызывать ЦПД в культуре клеток и тканей и размножаться в куриных эмбрионах.

**Бактериофаги.**

* Фаги широко распространены в природе, способны паразитировать в клетках бактерий и других микроорганизмов, способствуя их гибели (лизису).
* В 1917 г фр. ученый Ф.Д’Эрелль наблюдал, что при добавлении фильтрата испражнений больного дизентерией к бульонной культуре дизентерийных бактерий происходит их полный лизис.
* Ф.Д’Эрелль сделал заключение, что наблюдаемый им литический агент, проходящий через бактериальные фильтры, является вирусом бактерий, и назвал их ***«бактериофагом»*** (пожиратель бактерий).

**Строение бактериофагов.**

* Размеры фагов колеблются от 20 до 800 нм. Их подразделяют на несколько морфологических типов: нитевидные, кубические, сперматозоидной формы и т.д.
* Наиболее изучены колифаги Т ( от англ. *typе* – типовые). Существуют 7 представителей фагов Т группы, среди которых есть одиночные (T1, T3, T5, T7) и парные фаги (T2, T4, T6).
* Т2 фаги имеют наиболее сложное строение

**Характер взаимодействия с бактериальной клеткой.**

* В зависимости от типа взаимодействия с бактериальной клеткой различают **вирулентные** и **умеренные** бактериофаги
* В результате взаимодействия **вирулентных фагов** с бактериальной клеткой происходит ***лизис*** бактерий
* Данный процесс характеризуется просветлением бульонной культуры, т.е. образованием фаголизата. В культурах, растущих на плотной питательной среде участки лизиса бактерий проявляются в виде ***негативных колоний фага.***

**Взаимодействие вирулентных фагов с бактериальной клеткой.**

1. Адсорбция фагов на бактериальной клетке
2. Проникновение нуклеиновой кислоты фага внутрь бактериальной клетки
3. Репликация нуклеиновой кислоты и синтез белков фага
4. Формирование фаговой частицы
5. Выход фага из бактериальной клетки
6. После проникновения умеренного фага в бактериальную клетку ДНК фага встраивается в хромосому бактерии и существует вместе с ней, то есть развивается ***интегративная*** инфекция. Гибель клетки при этом не происходит.
7. ДНК бактериофага, встроенная в хромосому бактерии, называется ***профагом.***
8. Подобное сосуществование бактерии и умеренного бактериофага называется ***лизогенией,*** а культура бактерии, зараженная таким фагом - ***лизогенной***
9. Профаги некоторой части лизогенных бактерий могут исключаться из хромосом и переходить в вегетативное состояние. Этот процесс заканчивается продукцией фагов и лизисом бактерий
10. Превращение умеренного фага в вирулентный возможно под действием различных факторов, н-р, ионизирующего излучения, УФ-лучей и т.д.

**Дефектные фаги.**

* ***Дефектные фаги*** образуются в результате фрагментации бактериальной ДНК после фаговой инфекции и встраивания кусочка бактериальной ДНК в ДНК фага.
* Дефектные фаги, несущие в геноме частичку бактериальной ДНК при встраивании в геном могут придавать бактерии новые (морфологические, культуральные, биохимические, токсигенные и др.) свойства. Этот феномен изменения свойств под влиянием профага называется ***фаговой*** или ***лизогенной конверсией.***
* Н-р, токсигенность возбудителя дифтерии обусловлена наличием гена  *tox*, источником которого является лизогенный бактериофаг в интегрированном в хромому состоянии.
* Дефектные бактериофаги используют в качестве вектора в генной инженерии

**Получение бактериофагов.**

* Исследуемый материал ( воду, испражнения, раневое отделяемое) суспендируют и фильтруют. Фильтрат и гомологичную тест-культуру инокулируют в питательный бульон и инкубируют при 370C 18-24 ч.
* Затем инокулят центрифугируют и фильтруют с целью очищения от бактерий
* Фильтрат и тест культуру засевают на агар в чашки, и инкубируют. По мере роста бактериальной культуры на агаре наблюдается появление пятен (негативных колоний).
* Материал взятый из негативных колоний переносят в пробирку с бульоном, к нему добавляют тест-культуру и инкубируют. Фаги размножающиеся внутри бактерий вызывают их лизис , в пробирке получают фаголизат, состоящий из многочисленных фагов и полностью освобожденный от бактерий.

**Определение чувствительности бактерий к фагам основывается на строгой специфичности их действия**

* **Применение диагностических (известных) фагов позволяет идентифицировать неизвестную культуру микробов**
* **Исследуемую бактериальную культуру засевают газоном на поверхности плотной питательной среды в чашке Петри. Затем на поверхность агара наносят суспензию известного фага, и наклонив чашку способствуют растеканию жидкости. Чашки инкубируют в термостате.**
* **Чувствительность исследуемой культуры к фагу судят по наличию или отсутствию зоны лизиса в области контакта с фагом**

**Определение фаготипа (фаготипаж).**

Фаготип бактерий определяют с целью выявления источника инфекции

* Испытуемую суточную бульонную культуру засевают на плотную питательную среду в чашку Петри, задняя поверхность которой разграничена на квадраты.
* На каждый квадрат наносят по одной капле различных типоспецифических фагов пастеровской пипеткой
* После суточной инкубации просматривают чашку, отмечая те квадраты, в которых наблюдается лизис бактерий. Фаготип бактериальной культуры определяется тем типом фага, который вызвал лизис.
* Для определения активности бактериофаг титруют
* Титр бактериофагов определяют по методам Аппельмана и Грациа.

**Практическое применение фагов.**

* **Специфичность фагов составляет основу *фагодиагностики***

 **- Применение диагностических фагов позволяет проводить идентификацию неизвестной микробной культуры**

 **- Фаготипирование (*фаготипаж*) применяется для выявления источника заболевания**

* ***Фагопрофилактика* и *фаготерапия*** основывается способности фагов уничтожать чувствительные к ним бактерии в организме больного. С этой целью фаги выпускают в виде лекарственных препаратов