

Занятие 7

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

План занятия:

1. Вирусы, риккетсии и хламидии – как облигатные внутриклеточные паразиты.
2. Размножение вирусов. Особенности репродукции РНК и ДНК содержащих вирусов.
3. Размножение риккетсий и хламидий.
4. Культивирование вирусов, риккетсий и хламидий: чувствительные животные, куриные эмбрионы, культуры клеток.
5. Методы заражения лабораторных животных с целью культивирования облигатных внутриклеточных паразитов (внутрибрюшинно, внутривенно, внутримышечно, интраназально, интрацеребрально и пр.)
6. Методы заражения куриных эмбрионов с целью культивирования облигатных внутриклеточных паразитов (в желточный мешок, амниотическую и аллантоисную полости, хорионлантоисную оболочку).
7. Заражение тканевых культур с целью культивирования облигатных внутриклеточных паразитов.
8. Техника приготовления однослойных культур клеток и их типы (первичные, перевиваемые, полуперевиваемые).
9. Выявление облигатных внутриклеточных паразитов в зараженных тест-системах или в патологическом материале: индикация (ЦПД-цитопатическое действие, гемагглютинация, гемадсорбция, внутриклеточные включения, цветная проба, бляшкообразование и пр.) и идентификация (РТГА, РСК и пр.)
10. Фаги, строение, типы и свойства, роль в молекулярной генетике.
11. Типы взаимодействия бактериофагов с бактериальной клеткой: вирулентные и умеренные бактериофаги.
12. Лизогенные бактерии и их обнаружение.
13. Методы выделения фагов из различных объектов и их титрование (методы Аппельмана и Грация)
14. Применение фагов:
 - фагодиагностика: реакция нарастания титра фага, выявление фагов в патологическом материале,
 - фаготипирование
 - фаготерапия
 - фагопрофилактика

Культивирование облигатных внутриклеточных бактерий, относящихся к родам *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Coxiella* и *Chlamydia*, осуществляют на культурах клеток или в организме животных и членистоногих, а также в куриных эмбрионах (за исключением эрлихий). Куриные эмбрионы используют также для культивирования бактерий, обладающих высоким уровнем гетеротрофности, например родов *Borrelia*, *Legionella*.

Культивирование вирусов человека и животных проводят в целях лабораторной диагностики вирусных инфекций, для изучения патогенеза и иммунитета при вирусных инфекциях, а также для получения диагностических и вакцинных препаратов. Вирусы культивируют на трех биологических моделях: в организме лабораторных животных, в развивающихся эмбрионах птиц (чаще на куриных эмбрионах) и культурах клеток (тканей).

Выращенные вирусы определяют с помощью методов индикации и идентификации. Индикация вирусов, т.е. обнаружение факта их репродукции, основана на выявлении различных биологических свойств вирусов и особенностей их взаимодействия с чувствительными клетками. Идентификация (определение вида, типа) вирусов осуществляется в основном с помощью иммунологических реакций, основанных на взаимодействии антигенов вирусов и соответствующих им антител.

Лабораторных животных (взрослых или новорожденных белых мышей, хомяков, кроликов, обезьян и др.) заражают исследуемым вируссодержащим материалом различными способами (подкожно, внутримышечно, интраназально, интрацеребрально и т.д.) в зависимости от тропизма вирусов. Использование животных для культивирования вирусов в диагностических целях весьма ограничено из-за видовой невосприимчивости животных ко многим вирусам человека, контаминации животных посторонними микробами, а также по экономическим и этическим соображениям.

О репродукции вирусов в организме животных судят по развитию у них видимых клинических проявлений заболевания, патоморфологическим изменениям органов и тканей, а также на основании реакции гемагглютинации (РГА) с суспензией из органов, содержащих вирусы. РГА основана на способности многих вирусов вызывать склеивание (агглютинацию) эритроцитов человека, птиц и млекопитающих в результате взаимодействия вирусных белков (гемагглютининов) с рецепторами эритроцитов.

Куриные эмбрионы (5–12-дневные) заражают путем введения исследуемого материала в различные полости и ткани зародыша. Таким образом можно культивировать вирусы гриппа, герпеса, натуральной оспы и др. Достоинствами модели являются: возможность накопления вирусов в больших количествах; отсутствие скрытых вирусных инфекций; доступность для любой лаборатории. О репродукции вирусов в куриных эмбрионах свидетельствуют: специфические поражения оболочек и тела эмбриона (оспины, кровоизлияния); гибель эмбриона; положительная РГА с вируссодержащей жидкостью, полученной из полостей зараженного зародыша.

Методику культивирования вирусов в развивающихся эмбрионах птиц используют при промышленном выращивании вирусов. Однако многие вирусы не размножаются в эмбрионах птиц; почти неограниченные возможности для культивирования вирусов появились после открытия метода культур клеток.

Культуру клеток (тканей) наиболее часто применяют для культивирования вирусов. Клетки, полученные из различных органов и тканей человека, животных, птиц и других биологических объектов, размножают вне организма на искусственных питательных средах в специальной лабораторной посуде. Большое распространение получили культуры клеток из эмбриональных и опухолевых

(злокачественно перерожденных) тканей, обладающих по сравнению с нормальными клетками взрослого организма более активной способностью к росту и размножению.

При выращивании культур клеток необходимо выполнение ряда условий:

- 1) соблюдение правил асептики;
- 2) использование лабораторной посуды из нейтрального стекла (пробирки, флаконы, матрасы)
- 3) использование сложных питательных сред (среда 199, Игла), содержащих минеральные соли, аминокислоты, витамины, глюкозу, сыворотку крови животных или человека и буферные растворы
- 4) добавление антибиотиков к питательной среде для подавления роста посторонних микробов;
- 5) соблюдение оптимальной температуры роста клеток.

В зависимости от техники приготовления различают однослойные, суспензионные и органные культуры клеток.

- Однослойные культуры клеток. Клетки способны прикрепляться и размножаться на поверхности химически нейтрального стекла лабораторной посуды в виде монослоя.

- Суспензионные культуры клеток. Клетки размножаются во всем объеме питательной среды при постоянном ее перемешивании с помощью магнитной мешалки или во вращающемся барабане.

- Органные культуры — цельные кусочки органов и тканей, сохраняющие исходную структуру вне организма (применяются ограниченно).

Культуры клеток в процессе их культивирования способны проходить десятки генераций. По числу жизнеспособных генераций культуры клеток подразделяют на: 1) первичные, или первично-трипсинизированные; 2) перевиваемые, или стабильные; 3) полуперевиваемые.

Первичные культуры клеток способны размножаться только в первых генерациях, т.е. выдерживают не более 5–10 пассажей после выделения из тканей. В основе получения первичных культур лежит обработка кусочков тканей (эмбриональных, опухолевых или нормальных) протеолитическими ферментами, например трипсином, который разрушает межклеточные связи в тканях и органах с образованием изолированных клеток.

Перевиваемые (стабильные) культуры клеток способны размножаться в лабораторных условиях неопределенно длительный срок (десятки лет), т.е. выдерживают многочисленные пассажи. Их получают главным образом из опухолевых или эмбриональных тканей, обладающих большой потенцией роста. Перевиваемые культуры клеток имеют преимущества перед первичными культурами. Однако злокачественный характер клеток и соматические мутации, претерпеваемые нормальными клетками в процессе многочисленных генераций, ограничивают использование этого вида культур, в частности невозможно их применение в производстве вирусных вакцин.

Полуперевиваемые культуры клеток имеют ограниченную продолжительность жизни и выдерживают 40–50 пассажей. Их обычно получают из диплоидных клеток эмбриона человека. В процессе пассажей эти культуры сохраняют диплоидный набор хромосом, характерный для соматических клеток исходной ткани, и не

претерпевают злокачественной трансформации. Поэтому полуперевиваемые культуры клеток могут быть использованы как в диагностике, так и в производстве вакцин.

О репродукции вирусов в культуре клеток, зараженных вирусосодержащим материалом, можно судить на основании следующих феноменов: цитопатогенного действия вирусов, или цитопатического эффекта, образования внутриклеточных включений; образования «бляшек»; реакций гемадсорбции и гемагглютинации; «цветной» реакции.

Цитопатогенное действие (ЦПД) — патологические изменения морфологии клеток, вплоть до их гибели, возникающие в результате репродукции вирусов и наблюдаемые под микроскопом. В одних случаях быстро вакуолизируется цитоплазма, разрушаются митохондрии, округляются и гибнут клетки, а в других — формируются гигантские многоядерные клетки (так называемые симпласты), или наблюдается явление клеточной пролиферации, которое в итоге заканчивается деструкцией клеток. Таким образом, характер ЦПД позволяет использовать этот феномен не только для индикации вирусов, но и для их ориентировочной идентификации в культуре клеток.

Некоторые вирусы можно обнаружить и идентифицировать по внутриклеточным включениям, которые образуются в ядре или цитоплазме зараженных клеток. Часто включения представляют собой скопления вирусных частиц или отдельных компонентов вирусов, иногда могут содержать клеточный материал. Выявляют включения с помощью светового или люминесцентного микроскопа после окрашивания зараженных клеток соответственно анилиновыми красителями или флюорохромами. Включения могут отличаться по величине (от 0,2 до 25 мкм), форме (округлые или неправильные) и численности (одинокые и множественные). Характерные цитоплазматические включения формируются в клетках, инфицированных вирусом натуральной оспы (тельца Гварниери), бешенства (тельца Бабеша—Негри), а внутриядерные включения — при заражении аденовирусами или вирусами герпеса.

«Бляшки», или «негативные колонии», — ограниченные участки разрушенных вирусами клеток в сплошном монослое культуры клеток, культивируемых на питательной среде под агаровым покрытием. Они видны невооруженным глазом в виде светлых пятен на фоне окрашенного монослоя живых клеток. Добавление агара в питательную среду ограничивает распространение вирусов по всему монослою после выхода их из разрушенной клетки и обеспечивает взаимодействие вирусов только с соседними клетками. Каждая «бляшка» образуется потомством одного вириона. Подсчитав количество «бляшек», можно определить концентрацию вирусов в исследуемом материале. Кроме того, «бляшки» разных групп вирусов отличаются по размеру, форме, срокам появления. Поэтому данный метод используют для дифференциации вирусов, а также для селекции штаммов и получения чистых линий вирусов.

Реакция гемадсорбции основана на способности культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты. Целый ряд вирусов (гриппа, парагриппа и др.) обладают гемадсорбирующими свойствами, что позволяет использовать реакцию гемадсорбции для индикации этих вирусов даже без выраженного ЦПД в культуре клеток. Механизмы реакции гемадсорбции и

гемагглютинации сходны. Поэтому для обнаружения репродукции некоторых вирусов в культуре клеток можно использовать реакцию гемагглютинации с культуральной жидкостью, т.е. с питательной средой, содержащей размножившиеся вирусы.

О репродукции вирусов в культуре клеток можно также судить по так называемой «цветной» реакции. Она регистрируется по изменению цвета индикатора, находящегося в питательной среде для культур клеток. Если вирусы не размножаются в культуре клеток, то живые клетки в процессе своего метаболизма выделяют кислые продукты, изменяющие рН среды и соответственно цвет индикатора. При репродукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается (клетки гибнут), и среда сохраняет первоначальный цвет индикатора.

Бактериофаги (от греч. phagos — пожирающий), или фаги, — вирусы бактерий, специфически проникающие в бактерии и паразитирующие в них вплоть до гибели (лизиса) бактериальной клетки.

Бактериофаги широко распространены: они выявлены у большинства бактерий, а также у других микроорганизмов, например у грибов.

Строение бактериофагов изучают с помощью электронной микроскопии образцов, контрастированных напылением металлов или фосфорно-вольфрамовой кислотой. В зависимости от формы и структурной организации фаги подразделяют на: нитевидные; мелкие кубические (некоторые из них имеют аналоги отростков); фаги сперматозоидной формы, т.е. с кубической головкой и хвостовым отростком, имеющие сокращающийся или несокращающийся чехол отростка. Размеры фагов колеблются от 20 до 800 нм (нитевидный тип).

Наиболее изучены крупные бактериофаги, имеющие форму сперматозоида и сокращающийся чехол отростка. Они состоят из головки икосаэдрического типа размером 65–100 нм и хвостового отростка длиной более 100 нм. Хвостовой отросток имеет внутри полый цилиндрический стержень, сообщающийся с головкой, а снаружи — чехол, способный к сокращению, наподобие мышцы. Чехол присоединен к воротничку, окружающему стержень около головки. На дистальном конце отростка имеется шестиугольная базальная пластинка с шипами, от которых отходят нитевидные структуры — фибриллы (нити). Бактериофаги содержат или ДНК, или РНК. Большинство фагов содержит двунитевую ДНК, замкнутую в кольцо.

Молекула двунитевой суперспирализованной ДНК находится внутри головки и защищена капсидом. Капсид состоит из идентичных полипептидных субъединиц, уложенных по икосаэдрическому (кубическому) типу симметрии. В состав головки также входит полипептид, состоящий из аспарагиновой, глутаминовой кислот и лизина. У некоторых фагов внутри головки находится внутренний гистонотипный белок, обеспечивающий суперспирализацию ДНК. Сокращающийся чехол хвостового отростка образован также белковыми субъединицами, уложенными по спиральному типу симметрии, содержащими АТФ и ионы Ca^{2+} . У некоторых фагов в дистальной части отростка содержится фермент лизоцим.

Бактериофаги инактивируются под действием температуры 65–70°C, УФ-облучения в высоких дозах, ионизирующей радиации, формалина и кислот. Длительно сохраняются при низкой температуре и высушивании.

Взаимодействие фагов с бактериальной клеткой. Бактериофаги инфицируют строго определенные бактерии, взаимодействуя со специфическими рецепторами клетки. По специфичности взаимодействия различают следующие бактериофаги: поливалентные, моновалентные, типовые,

Взаимодействие фагов с бактериями может протекать по продуктивному, abortивному и интегративному типам. При продуктивном типе взаимодействия образуется фаговое потомство, бактерии лизируются; при abortивном типе — фаговое потомство не образуется и бактерии сохраняют свою жизнедеятельность; при интегративном типе — геном фага встраивается в хромосому бактерии и сосуществует с ней. В зависимости от типа взаимодействия различают вирулентные и умеренные бактериофаги.

Вирулентные бактериофаги взаимодействуют с бактерией по продуктивному типу. Для внедрения в бактерию они адсорбируются на специфических рецепторах клетки, в том числе на липополисахаридах, липопротеинах, тейхоевых кислотах, протеинах или даже на пилях. Проникнув в бактерию, они репродуцируются с образованием 200–300 новых фаговых частиц и вызывают лизис бактерий. Весь литический цикл от адсорбции бактериофага на бактерии до его выхода из нее занимает 20–40 мин.

Умеренные бактериофаги в отличие от вирулентных взаимодействуют с чувствительными бактериями либо по продуктивному, либо по интегративному типу. При интегративном типе взаимодействия ДНК умеренного фага встраивается в хромосому бактерии, реплицируется синхронно с геномом размножающейся бактерии, не вызывая ее лизиса. ДНК бактериофага, встроенная в хромосому бактерии, называется *профагом*, а культура бактерий — лизогенной. Такое сосуществование бактерии и умеренного бактериофага называется *лизогенией*. Профаг, ставший частью хромосомы бактерии, при ее размножении передается по наследству потомкам. При лизогении образование фагового потомства не происходит. Однако термин «лизогения» отражает потенциальную возможность лизиса бактерии, содержащей профаг. Действительно, профаги некоторой части лизогенной культуры бактерий могут спонтанно (самопроизвольно) или направленно под действием ряда физических или химических факторов дерепрессироваться, исключаться из хромосомы, переходить в вегетативное состояние. Этот процесс заканчивается продукцией фагов и лизисом бактерий.

Геном профага может придавать бактерии новые, ранее отсутствовавшие у нее свойства. Этот феномен изменения свойств микроорганизмов под влиянием профага получил название *фаговой конверсии*. Конвертироваться могут морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и другие свойства бактерий. Например, наличие профага в дифтерийной палочке обуславливает ее способность продуцировать дифтерийный экзотоксин.

Умеренные фаги могут быть дефектными, т.е. неспособными образовывать зрелые фаговые частицы ни в естественных условиях, ни при индукции. Геном некоторых умеренных фагов (P1) может находиться в цитоплазме бактериальной клетки в так называемой плазмидной форме, не включаясь в ее хромосому. Такого рода умеренные фаги используют в качестве векторов в генной инженерии.

Бактериофаги используют в лабораторной диагностике инфекций при внутривидовой идентификации бактерий, т.е. определении фаговара (фаготипа). Фаговар бактерии определяется тем типом фага, который вызвал ее лизис (образование стерильного пятна, «бляшки», или «негативной колонии», фага). Методику фаготипирования используют для выявления источника и путей распространения инфекции (эпидемиологическое маркирование).

Фаги применяют также для лечения и профилактики ряда бактериальных инфекций. Производят брюшнотифозный, сальмонеллезный, дизентерийный, синегнойный, стафилококковый, стрептококковый фаги и комбинированные препараты (колипротейный, пиобактериофаги и др).

Бактериофаги широко применяют в генной инженерии в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.