

Занятие 22

Введение в медицинскую вирусологию.

**Патогенез и лабораторная диагностика
вирусных инфекций.**

Вирусология

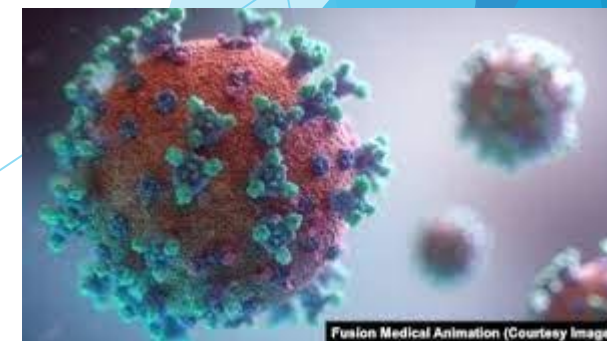


- ▶ Термин «вирус» применил еще Л. Пастер для обозначения заразного начала. В настоящее время под вирусом подразумеваются мельчайшие реплицирующиеся микроорганизмы, находящиеся всюду, где есть живые клетки.
- ▶ Вирусы — разнообразная и гетерогенная группа микроорганизмов, способных инфицировать большинство групп более сложно организованных организмов, включая бактерии, сине-зеленые водоросли, грибы, растения, насекомых и позвоночных.
- ▶ Вирусология изучает морфологию, строение, экологию, генетику, молекулярную биологию вирусов, механизмы их репликации, направления и механизмы эволюции; эпидемиологию, методы лабораторной диагностики, профилактики и лечения вызываемых ими заболеваний.



Вирусы

- ▶ **Вирусы имеют кардинальные отличия от других прокариотических микроорганизмов:**
- ▶ 1. Не имеют клеточного строения. Это неклеточные формы биологической жизни.
- ▶ 2. Имеют субмикроскопические размеры, варьирующие у вирусов человека в пределах 15–250 и более нм
- ▶ 3. Характеризуются только одним типом нуклеиновой кислоты: или ДНК, или РНК в качестве генома.
- ▶ 4. Вирусы не обладают собственными системами метаболизма и получения энергии.
- ▶ 5. Репликация вирусов происходит в клетках с использованием их белоксинтезирующих и энергетических систем, поэтому они — облигатные внутриклеточные паразиты.
- ▶ 6. Вирусы не способны к прогрессивному росту и делению. Они образуются в виде зрелых форм (вирионов) путем самосборки из готовых, т. е. преформированных компонентов (белков, нуклеиновых кислот).



Fusion Medical Animation (Courtesy Image)

- ▶ К сегодняшнему дню классификация вирусов претерпела девять редакций. Ратифицированная версия 2016 г. насчитывает 4404 вида, 735 родов, 35 подсемейств, 122 семейств, 8 порядков вирусов.
- ▶ В основе используемой универсальной системы — условно выбранная иерархия, соответствующая *виду-роду-подсемейству-семейству-порядку*.

В классификации вирусов находят применение следующие критерии:

- ▶ – тип нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), её структура (одно- или двунитчатая, линейная, циркулярная, непрерывная или фрагментированная);
- ▶ – стратегия вирусного генома (т. е. используемый вирусом путь транскрипции, трансляции, репликации);
- ▶ – строение вириона (наличие липопротеидной оболочки (суперкапсида), размер и морфология, тип симметрии, число капсомеров и т. п.);
- ▶ – антигенные и физико-химические свойства; – феномены генетических взаимодействий;
- ▶ – экологические взаимодействия (круг восприимчивых хозяев, ареал географического распространения);
- ▶ – механизмы патогенности (характер изменений в клетках, образование внутриклеточных включений, изменения экспрессии генов клеток хозяина, апоптоз и трансформация клеток);
- ▶ – способы передачи и резистентность к факторам внешней среды (γ -излучению, температуре, действию детергентов, эфира, противовирусным препаратам);
- ▶ – особенности инфекционного процесса и его эпидемиология

КЛАССИФИКАЦИЯ И МОРФОЛОГИЯ ВИРУСОВ

ВИРУСЫ С ОБОЛОЧКОЙ

ДНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Herpesviridae



Hepadnaviridae



Poxviridae

ВИРУСЫ БЕЗ ОБОЛОЧКИ

ДНК - ДВУНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Adenoviridae



Polyomaviridae
Papillomaviridae

ДНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Parvoviridae



Circinoviridae

РНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Coronaviridae



Paramyxoviridae



Bunyaviridae



Arenaviridae



Orthomyxoviridae



Retroviridae



Rhabdoviridae



Togaviridae



Flaviviridae



Filoviridae



Reoviridae

РНК - ОДНОНИТЕВЫЕ ВИРУСЫ



Picornaviridae



Caliciviridae

Рис. 4.6. Классификация и морфология вирусов

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИРУСА С КЛЕТКОЙ

РЕПРОДУКЦИЯ (РАЗМНОЖЕНИЕ) ВИРУСОВ

- ▶ Вирусы — облигатные внутриклеточные паразиты, способные размножаться только в живой клетке. В отличие от прокариотических и эукариотических микроорганизмов вирусы не размножаются бинарным делением.
- ▶ Увеличение количественного содержания вирусов в клетке происходит путем *репродукции* (англ. *reproduce* — воспроизводить, делать копию), то есть посредством биосинтеза множества молекул нуклеиновых кислот и белков с последующей их самосборкой в форме вирионов.
- ▶ Синтез нуклеиновых кислот и белков вируса происходит в разных частях клетки (ядре и цитоплазме).
- ▶ Такой способ репродукции получил название *дизъюнктивного* (разобщенного)

Процесс внутриклеточной репродукции вирусов условно разделяют на 2 фазы

- ▶ **Первая фаза включает 3 стадии:**
 - ▶ 1) адсорбцию вируса на рецепторах определенных типов клеток;
 - ▶ 2) проникновение вируса в клетку;
 - ▶ 3) депротенинизацию вириона.
- ▶ **Вторая фаза — синтетическая, включает стадии реализации стратегии вирусного генома:**
 - ▶ 1) транскрипцию,
 - ▶ 2) трансляцию,
 - ▶ 3) репликацию,
 - ▶ 4) сборку, созревание вирусных частиц;
 - ▶ 5) выход вирусных частиц из клетки.
- ▶ **Взаимодействие вируса с клеткой начинается с процесса адсорбции, т. е. с прикрепления вируса к поверхности клетки.**

Репродукция вируса в клетке



Реализация стратегии генома у ДНК-содержащих вирусов идет так же, как и в клетках хозяина:

ДНК ➡ транскрипция ➡ РНК ➡ трансляция белок.

У -РНК вирусов, т. е. вирусов с негативным геномом (вирусы гриппа, парагриппа и др.), путь реализации генома следующий:

-РНК ➡ транскрипция ➡ и-РНК ➡ трансляция ➡ белок.

У +РНК вирусов, т. е. с позитивным геномом (тогавирусы, пикорнавирусы), этап транскрипции отсутствует. Плюс-нить РНК генома выполняет функцию и-РНК, соответственно, путь реализации генома более прост:

+РНК ➡ трансляция ➡ белок.

Гепаднавирусы (вирус гепатита В) имеют в качестве генома циркулярную двуцепочечную ДНК. Их геном реплицируется через РНК интермедиат:

ДНК ➡ транскрипция ➡ РНК ➡ обратная транскрипция ➡ ДНК ➡ транскрипция ➡ и-РНК ➡ трансляция ➡ белок.

У ретровирусов (имеют геном в виде диплоидной +РНК и фермент обратную транскриптазу) — уникальный путь передачи генетической информации:

РНК ➡ обратная транскрипция ➡ ДНК ➡ транскрипция ➡ и-РНК ➡ трансляция ➡ белок.

ДНК-копия интегрируется с геномом клетки-хозяина (провирус).

Процесс взаимодействия генома вируса с геномом клетки-хозяина является сложным и далеко не полностью изученным. Вместе с тем известно, что в этом процессе участвует более 200 генов клетки-хозяина. Функция более 80 % из них угнетается, а примерно 20 % генов - активируется

Особенности вирусных инфекций

- ▶ 1. Вирусные инфекции — широко распространенные. Их удельный вес в структуре инфекционной заболеваемости составляет 60-80 %.
- ▶ 2. Вызывают состояние вирусемии.
- ▶ 3. Внутриклеточная репродукция вирусов приводит к массовой гибели клеток пораженных органов и систем организма.
- ▶ 4. Некоторые вирусы (гриппа, герпеса, ВИЧ, кори, гепатитов В и С) вызывают инфекции иммунной системы и индуцируют развитие вторичных иммунодефицитных состояний.
- ▶ 5. Интеграция некоторых вирусов с геномом клетки-хозяина (ВИЧ, вирус гепатита В, онкогенные РНК-геномные вирусы) оказывает влияние на экспрессию ее генов.
- ▶ 6. Тератогенные свойства некоторых вирусов (краснухи, цитомегалии).
- ▶ 7. Хронические вирусные инфекции могут индуцировать развитие опухолевой трансформации (аденовирусы, герпесвирусы, вирусы гепатитов В, С, G).
- ▶ 8. Могут вызывать медленные инфекции (ВИЧ, вирусы кори, краснухи, бешенства, гепатита В, герпеса и др.).
- ▶ 9. Средства иммунопрофилактики и химиотерапевтические препараты против многих вирусных инфекций отсутствуют.
- ▶ 10. Диагностика вирусных заболеваний сложна, дорогостояща из-за массовости ряда из них и применяется не во всех случаях.
- ▶ 11. В большинстве случаев диагностика вирусной инфекции носит ретроспективный характер.

ПАТОГЕНЕЗ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Патогенез вирусных инфекций – совокупность процессов, вызывающих заболевание и определяющих его развитие и исход.

Патогенез определяется следующими факторами:

1. тропизмом вируса (чувствительность к вирусу определенных клеток, тканей и органов макроорганизма).
2. скоростью репродукции вируса и количеством инфекционных частиц в потомстве;
3. реакцией клетки на инфекцию;
4. реакцией организма на вызванные инфекцией изменения клеток и тканей.

Виды вирусных инфекций человека в зависимости от тропизма возбудителей

- ▶ **Респираторные:** грипп, парагрипп, респираторно-гемолитическая инфекция, адено-, рино-, рео-, короновиральная инфекции, корь, паротит, краснуха, оспа, ветряная оспа и др.
- ▶ **Кишечные:** полиомиелит, Коксаки, ЕСНО, ротавирусная инфекция, гепатиты А и Е и др.
- ▶ **Кровяные (трансмиссивные):** ВИЧ-инфекция, гепатиты В, С и D, клещевой и японский энцефалиты, желтая лихорадка, лихорадка Денге, геморрагические лихорадки и др.
- ▶ **Инфекции наружных покровов:** бешенство, герпес, цитомегалия, ящур и др.

Особенности вирусных инфекций

- ▶ На уровне клетки выделяют **автономные** инфекции, если вирусный геном реплицируется независимо от клеточного, и **интегрированные** инфекции, если вирусный геном включается в состав клеточного.
- ▶ **Автономная** инфекция делится на *продуктивную*, при которой образуется инфекционное потомство вирионов, и *абортивную*, при которой инфекционный процесс обрывается, и новые вирусные частицы не образуются совсем или образуются в небольшом количестве.
- ▶ *Продуктивная* и *абортивная* инфекции могут быть острыми и хроническими.
- ▶ Острая инфекция в зависимости от исхода подразделяется на **цитолитическую** и **нецитолитическую**.
- ▶ **Цитолитическая** инфекция завершается **деструкцией** клеток, или ЦПД, а вирус, вызывающий ЦПД, называется цитопатогенным

АВТОНОМНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Продуктивная

Абортивная

Острая

Хроническая

Острая

Нецитолитическая

Цитолитическая

ИНТЕГРАТИВНАЯ ИНФЕКЦИЯ

**Интеграция
всего генома**

**Неопастическая
трансформация**

**Интеграция
части генома**

**Отсутствие
трансформации**

Особенности вирусных инфекций

На уровне организма вирусные инфекции делятся на 2 группы:

- 1) очаговые — вирус репродуцируется в клетках локально у места входных ворот;
- 2) генерализованные — вирус после локального размножения гематогенно или лимфогенно разносится в различные органы и ткани и формирует вторичные очаги инфекции.

Примеры очаговой инфекции — ОРВИ и ОКИ, генерализованной — полиомиелит, корь, оспа

Очаговая инфекция

острая

персистирующая

Манифестная

Инаппарантная

Латентная

Хроническая

Генерализованная инфекция

острая

персистирующая

Манифестная

Инаппарантная

Латентная

Хроническая

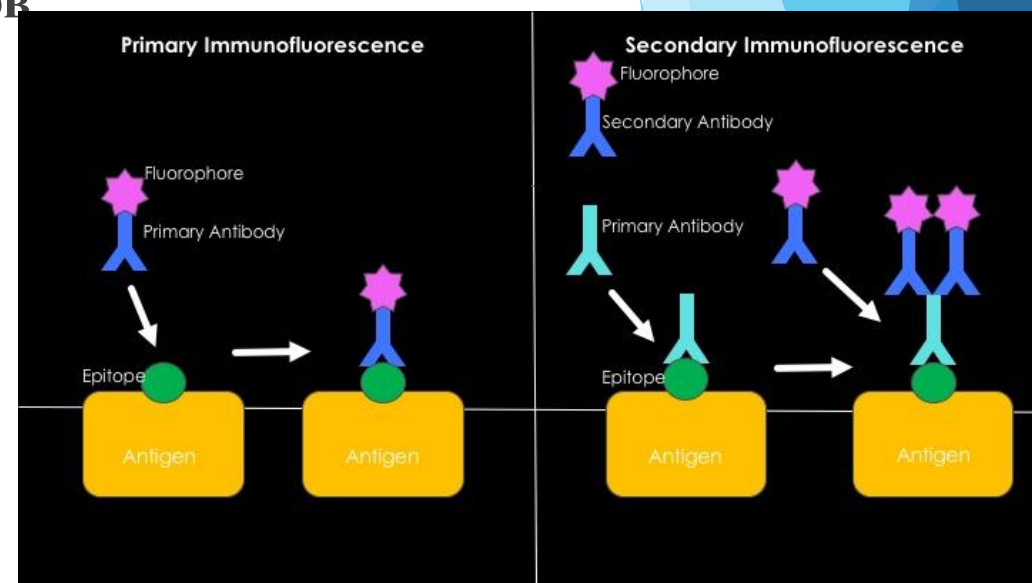
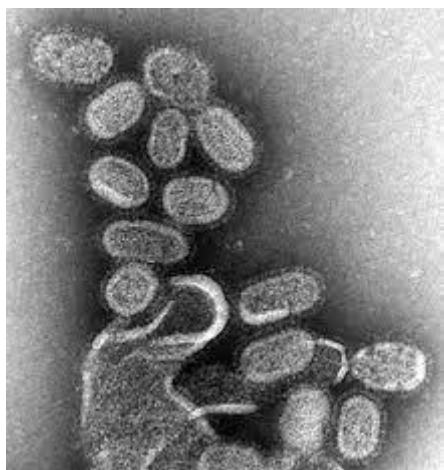
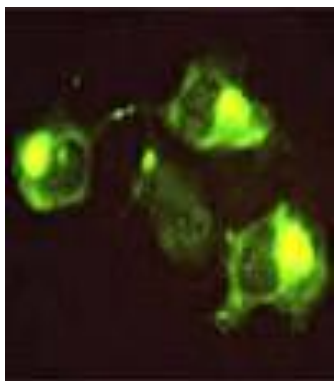
Медленная

ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

- ▶ В основе лабораторной диагностики вирусных инфекций лежат 4 группы методов:
- ▶ **1 группа** — обнаружение возбудителя или его компонентов непосредственно в клиническом материале, взятом от больного, и получение ответа через несколько часов (быстрая; экспресс-диагностика).
- ▶ **2 группа** — выделение вируса из клинического материала, его индикация и идентификация (вирусологический метод диагностики).
- ▶ **3 группа** — обнаружение в биологических жидкостях пациентов (крови, спинномозговой жидкости) антител к антигенным детерминантам вирусов (серологическая диагностика вирусных инфекций). В большинстве случаев для серологической диагностики требуются парные сыворотки, взятые в острой фазе заболевания и спустя 2–4 недели.
- ▶ **4 группа** — обнаружение вирусспецифических фрагментов генома вирусов в биологическом материале от больного и культуре клеток (молекулярно-биологические методы индикации, идентификации вирусов).

Методы экспресс-диагностики

- ▶ Используются при аденовирусной, риновирусной, герпесвирусных (ЦМВ, ветряная оспа) инфекциях, гриппе, РС-инфекции, гепатитах, ротавирусной инфекции и ВИЧ
- ▶ Материалом для исследования служат: отделяемое носоглотки, конъюнктивы, кровь, моча, кал, слюна, содержимое везикулы, биопсийный материал
- ▶ Применяют: РИФ, молекулярная гибридизация (МГ), ЭМ, ИФА, РИА, ПЦР, ИЭМ, ИБ, микроскопия мазков отпечатков



вирусологическое исследование

- ▶ Материалом для вирусологического исследования при заболеваниях, сопровождающихся диареей или другими **желудочно-кишечными расстройствами**, предполагающими вирусную этиологию (гепатит А, ротавирусные инфекции), являются **свежие порции фекалий**.
- ▶ **При заболеваниях дыхательной системы** (грипп, парагрипп, РС-инфекция, аденовирусная инфекция и др.) материал для исследования лучше всего получать **путем аспирации слизи, смывов**. Мазки из носоглотки менее информативны.
- ▶ При наличии везикулярной сыпи (**герпетическая инфекция**) материалом для исследования является жидкость, аспирированная иглой **из везикул**. При петехиальной и макулопапулезной сыпи — как пробы слизи из носоглотки, так и **фекалии**.
- ▶ При подозрении на **нейровирусные** инфекции (полиомиелит, арбовирусные инфекции) для вирусологического исследования следует забирать **слизь из носоглотки, фекалии и спинномозговую жидкость**.
- ▶ Для диагностики **эпидемического паротита и бешенства** материалом служит **слюна**.
- ▶ При подозрении на **цитомегало- и паповавирусные** инфекции материалом может быть **моча**.
- ▶ Попытку выделить вирус из **крови** можно предпринять при подозрении на инфекции, вызванные некоторыми **арбовирусами**, вирусами **герпеса, ВИЧ**.
- ▶ **Биопсия мозга** может быть проведена при диагностике **герпетического энцефалита, ИСПЭ, прогрессирующего краснушного панэнцефалита, болезни Крейтцфельда–Якоба**,

Выделение вируса из клинического материала осуществляется путем его инокуляции в культуру клеток, куриные эмбрионы или заражения им лабораторных животных

- ▶ **Индикация** вирусов в культуре клеток проводится по ЦПД, РИФ, РГА, РГА. Многие энтеровирусы вызывают раннее ЦПД (через несколько часов). Цитомегаловирусы, аденовирусы, вирус краснухи вызывают ЦПД через несколько недель, а иногда необходимо прибегать к получению субкультуры. Присутствие синцития свидетельствует о наличии таких вирусов, как респираторно-синцитиальный вирус, кори, эпидемического паротита, герпесвирусов.
- ▶ **Идентификация** вирусов, выделенных в этих системах, проводится с помощью серологических методов. Такие серологические реакции, как РТГА, РН, РТГА, используются только при вирусных инфекциях. РСК, РПГА, ИФА, РИА, РИФ, РП и др. используются для диагностики как вирусных инфекций, так и инфекций, вызванных другими возбудителями.
- ▶ В настоящее время широко используются методы молекулярной диагностики: МГ, ПЦР.

Основные принципы культивирования вирусов

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

культивирование вирусов в организме лабораторных животных

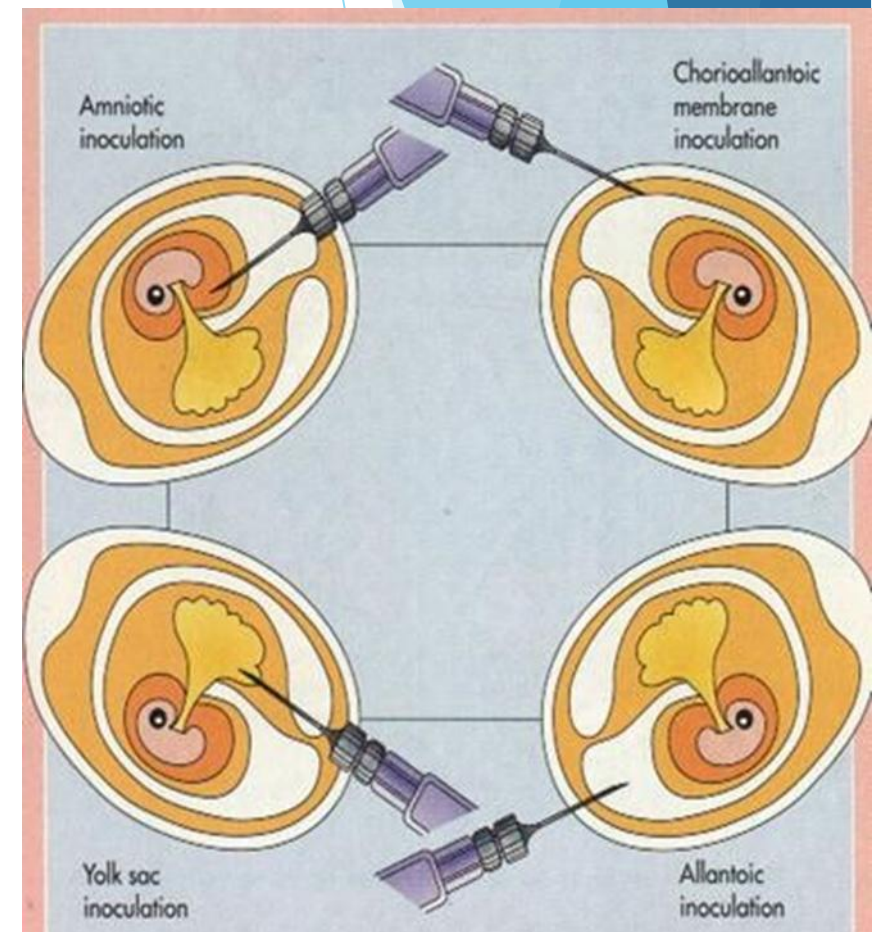
- ▶ При вирусологических исследованиях с этой целью используют новорожденные *лабораторные животные* (белые мыши, крысы, кролики, обезьяны и др.)
- ▶ При заражении лабораторных животных различными способами (подкожно, внутримышечно, внутривенно, интраназально, внутрибрюшинно и т.д.) необходимо учитывать 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

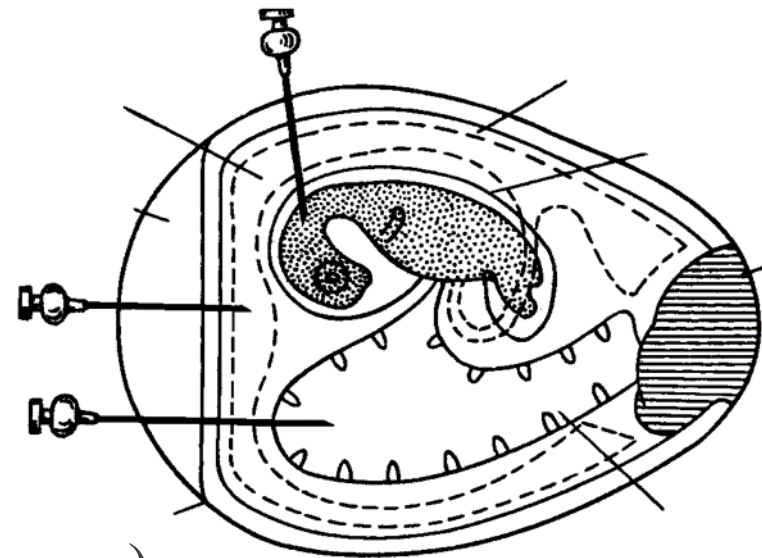
- ▶ *Куриные эмбрионы* являются благоприятной моделью для культивирования вирусов из-за возможности накопления в них большого количества вирусов, стерильности и доступной техники работы с ними и др.
- ▶ Обычно используют 6-12 дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ)
- ▶ Однако возможна контаминация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



Заражение куриных эмбрионов



- ▶ 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 вирусосодержащего 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 выше обозначенных 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

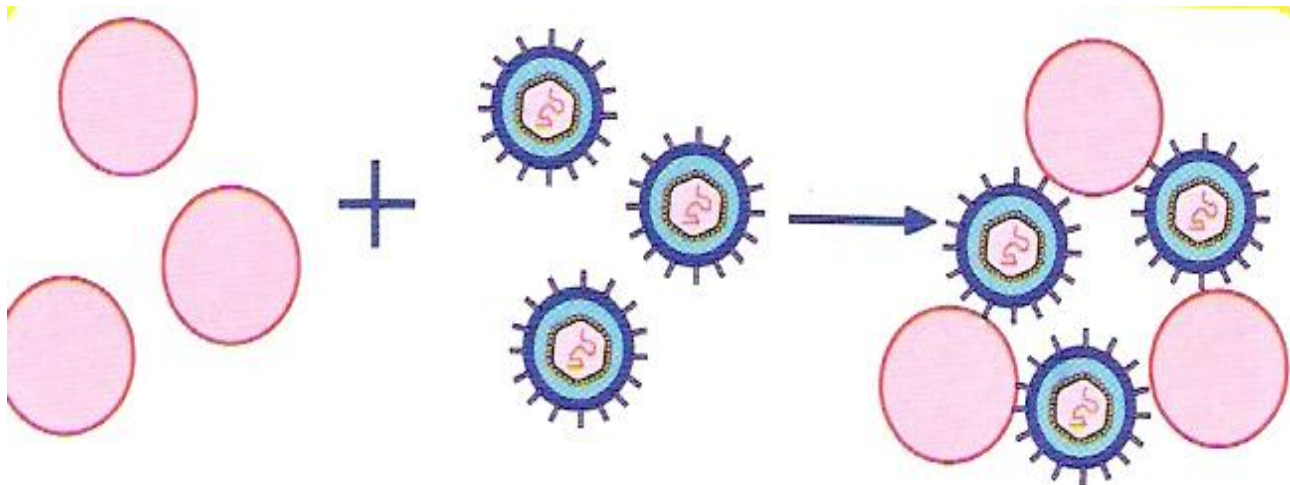
- ▶ Для более тщательного осмотра ХАО приподнимают пинцетом и срезают ножницами.
- ▶ Для осмотра и взятия всей ХАО удаляют зародыш, желточный мешок и белок, а хорионаллантоисную оболочку отслаивают от внутренней поверхности скорлупы, извлекают и переносят в стерильную чашку Петри с физиологическим раствором. 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 -4°C
- ▶ 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

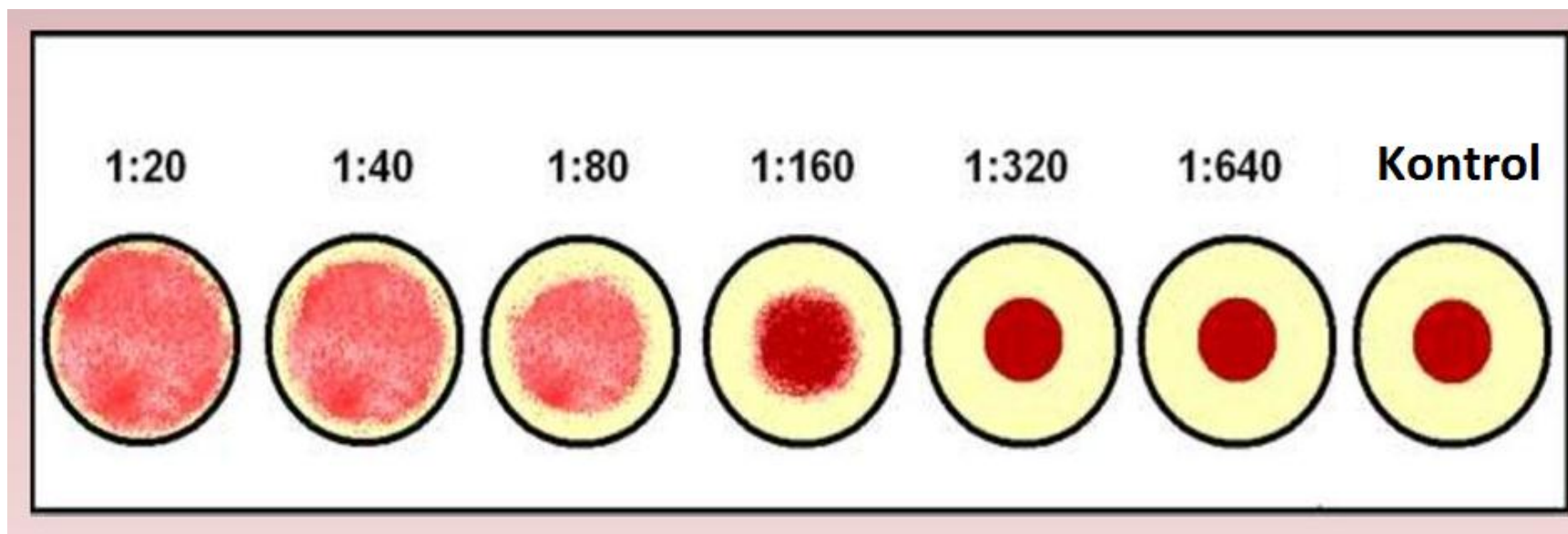
- ▶ Обнаружение вируса в аллантоисной и амниотической жидкостях зараженного эмбриона проводят постановкой *реакции гемагглютинации*.
- ▶ Реакция основывается на способности антигенов некоторых вирусов (гемагглютининов) агглютинировать (склеивать) эритроциты животных и используется при индикации вирусов



Техника реакции гемагглютинации

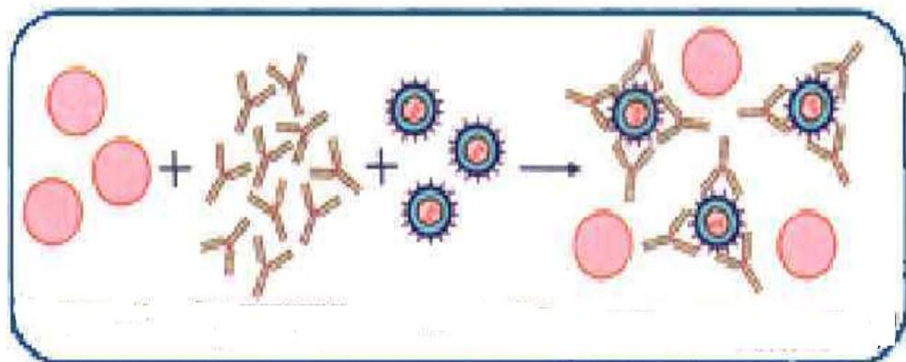
- ▶ После вскрытия амниотическую и аллантоисную жидкость разливают в пробирки или лунки плексигласовой пластины в объеме 0,5 мл (для контроля берут 0,5 мл такой же жидкости незараженного эмбриона).
- ▶ Затем добавляют по 0,2 мл 1% суспензии отмытых куриных эритроцитов и выдерживают при комнатной температуре.
- ▶ 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

Техника реакции гемагглютинации

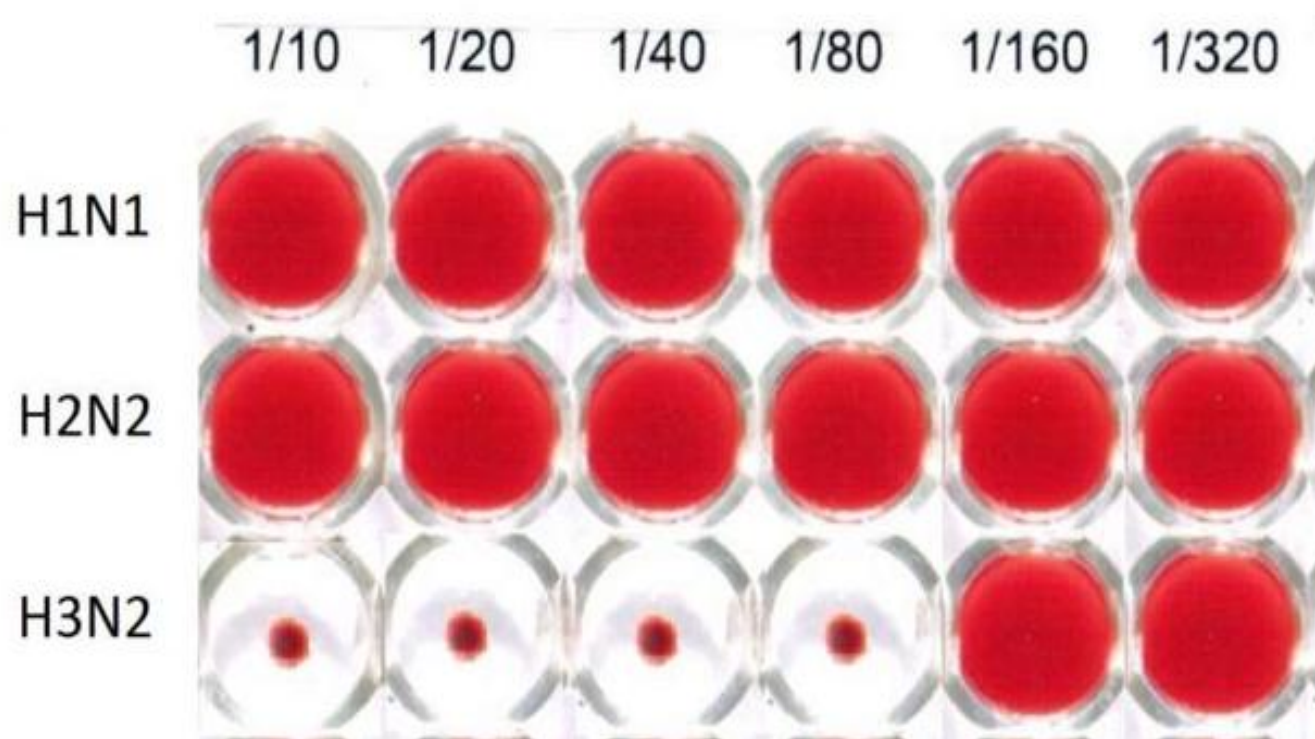


Реакция торможения гемагглютинации

- ▶ 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



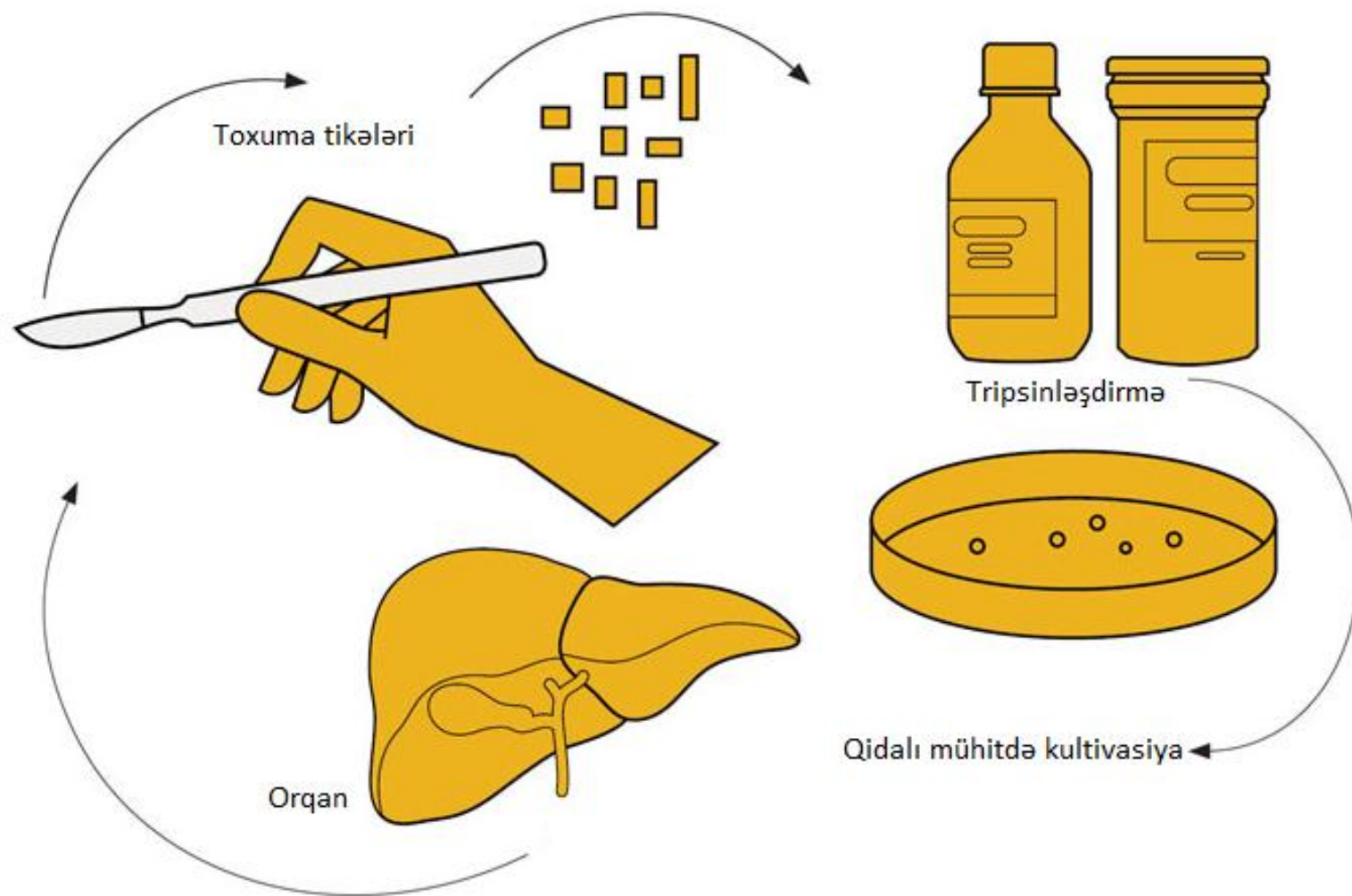
Техника реакции торможения гемагглютинации



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.

Получение клеточных культур



Культивация вирусов в культуре клеток (тканей)

▶ Клеточные (тканевые) культуры:

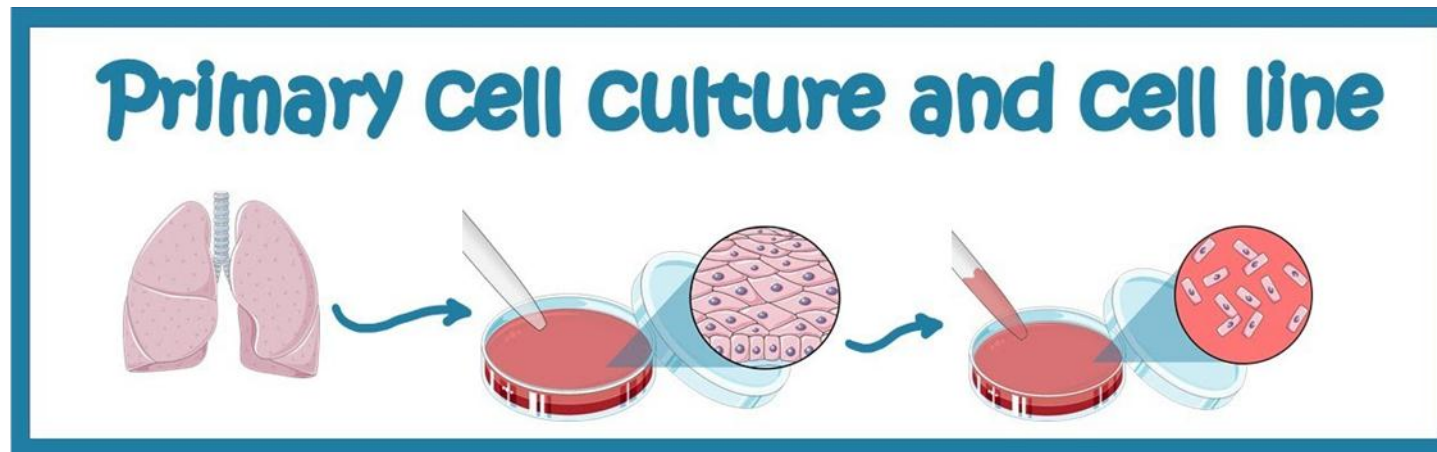
1. однослойные
2. суспензионные
3. органные

▶ Однослойные культуры клеток

1. Первичные культуры клеток
2. Перевиваемые (стабильные) культуры клеток
3. Полуперевиваемые культуры клеток

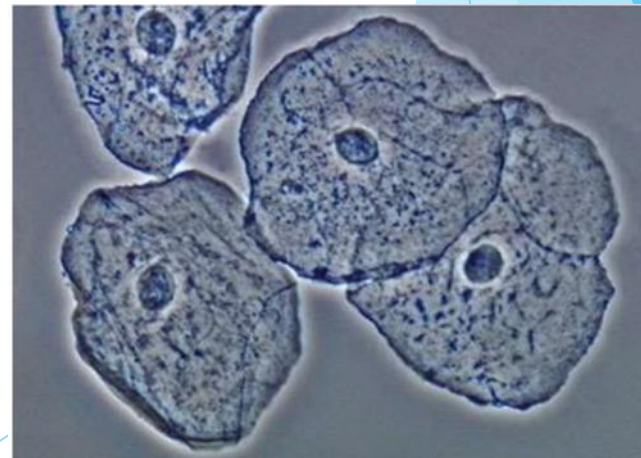
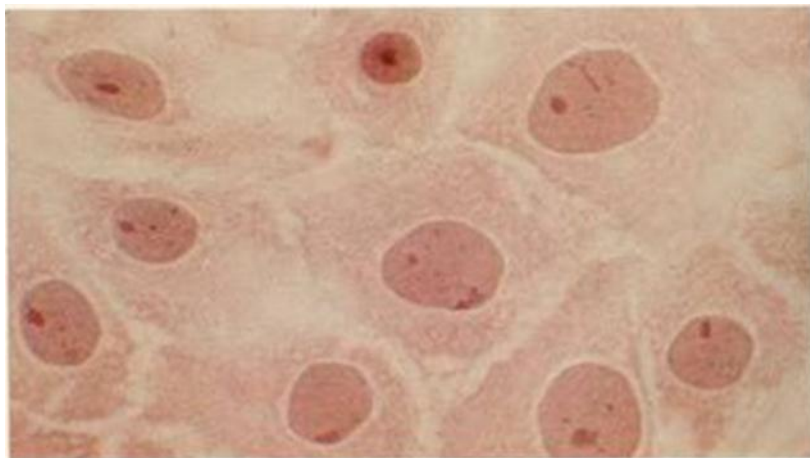
Первичные культуры клеток

- ▶ 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



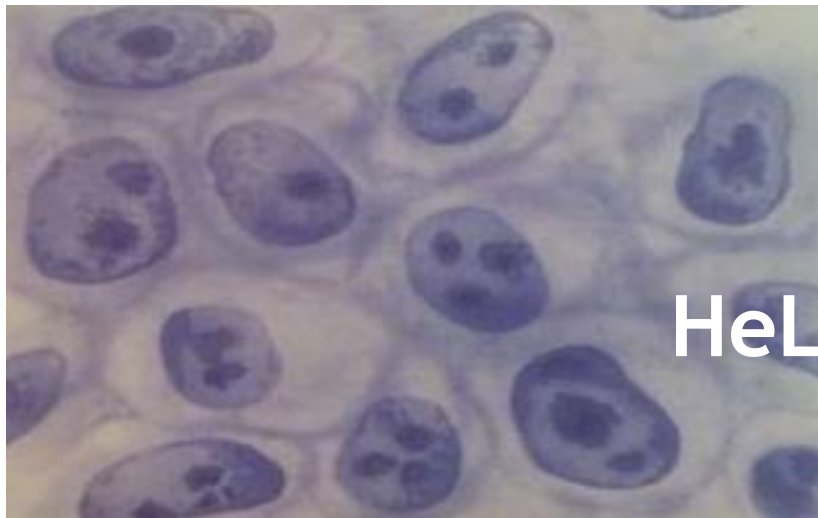
Первичные культуры клеток

- ▶ 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 (НЕК) 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



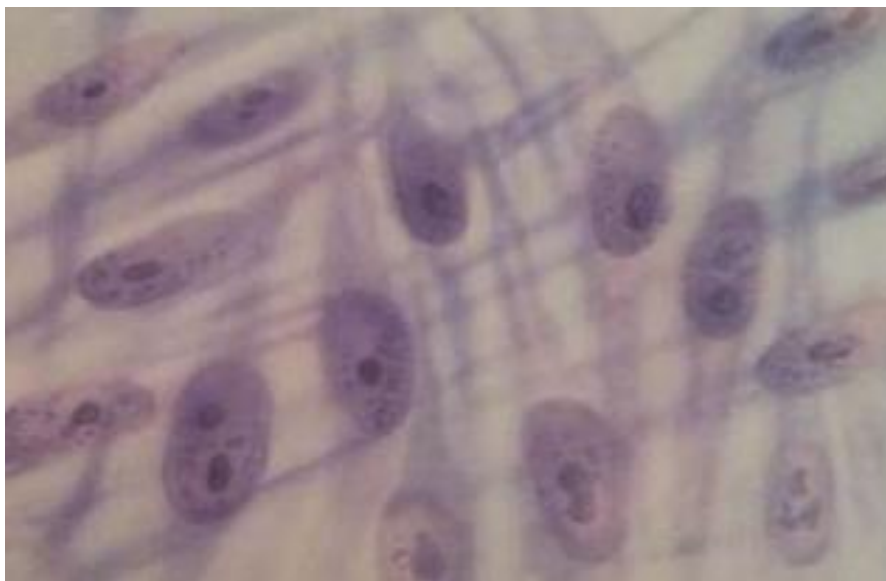
Перевиваемые культуры клеток

- ▶ *Перевиваемые (стабильные) культуры клеток* способны размножаться неопределенно длительное время (десятки лет), т.е. выдерживают многочисленные пассажы
- ▶ 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: (A-0, A-1, FL) – из культуры клеток амниона человека, HeLa —из карциномы шейки матки; Нер-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

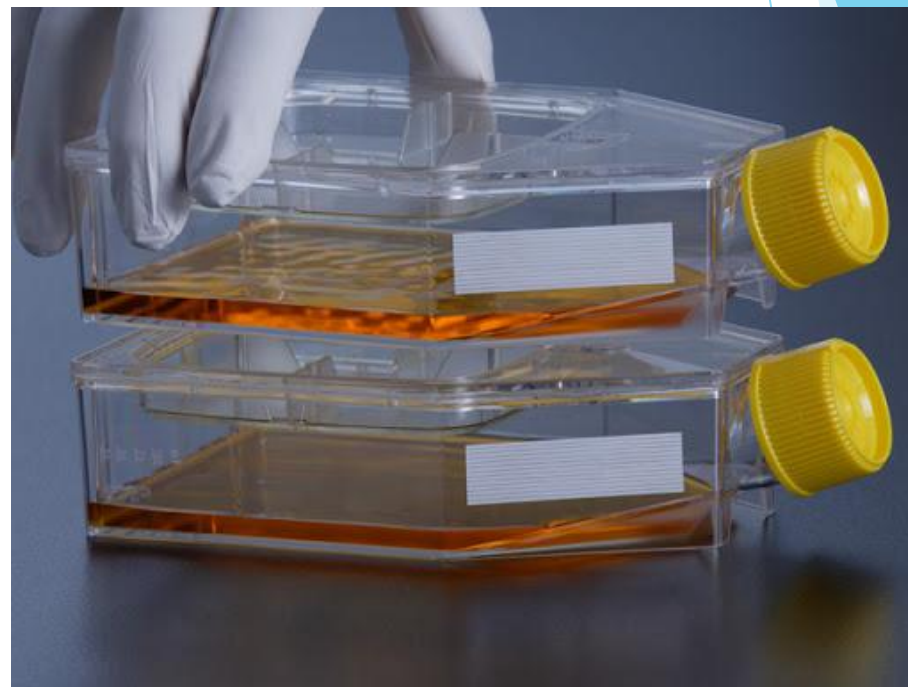
- ▶ Среда содержит полный набор аминокислот, витаминов и ростовые факторы.
- ▶ Наряду с сухими средами и готовыми компонентами выпускают готовые жидкие среды (199, Игла, гидролизат лактальбумина, сухие среды и концентраты)
- ▶ Среда подразделяют на ростовые и поддерживающие. Для выращивания клеточных 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%

Питательные среды используемые для выращивания культур клеток

В среды добавляют феноловый красный, который в кислой среде приобретает желто-оранжевый, а в щелочной - малиновый (темно-красный) цвет.



Лабораторная посуда для культивирования



Лабораторная посуда для культивирования

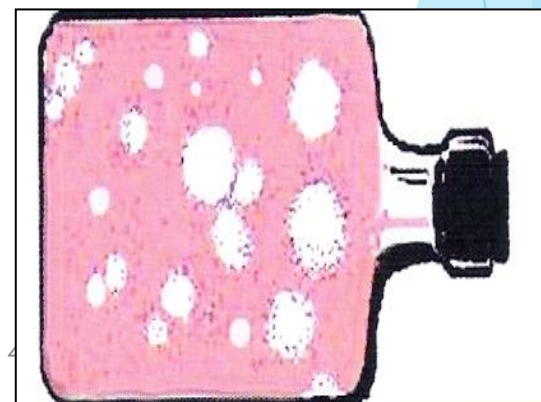
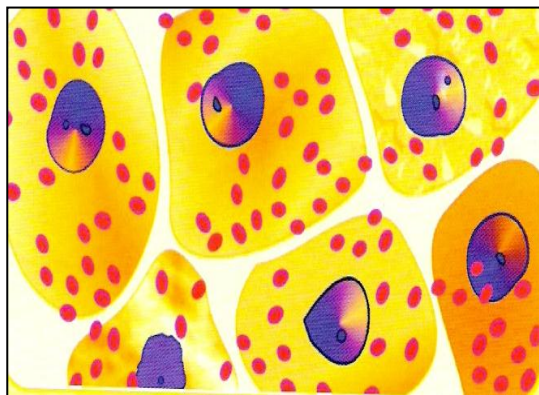
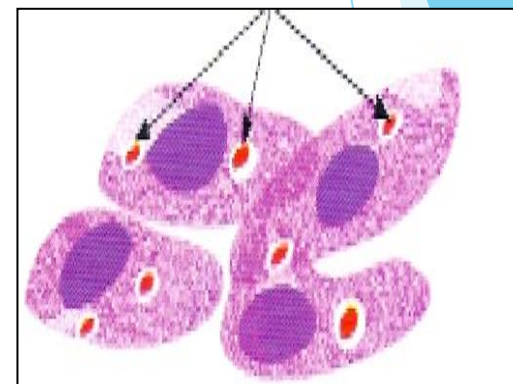
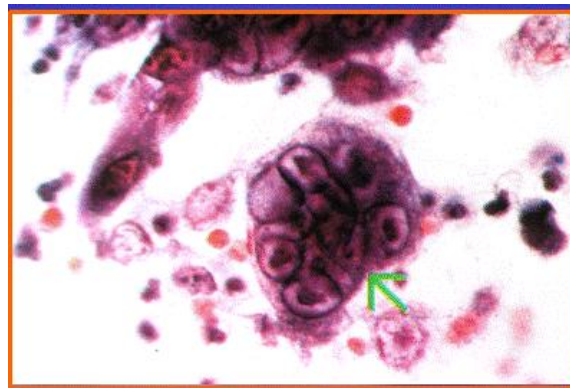


Методы индикации вирусов в культуре клеток

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

Методы индикации вирусов в культуре клеток

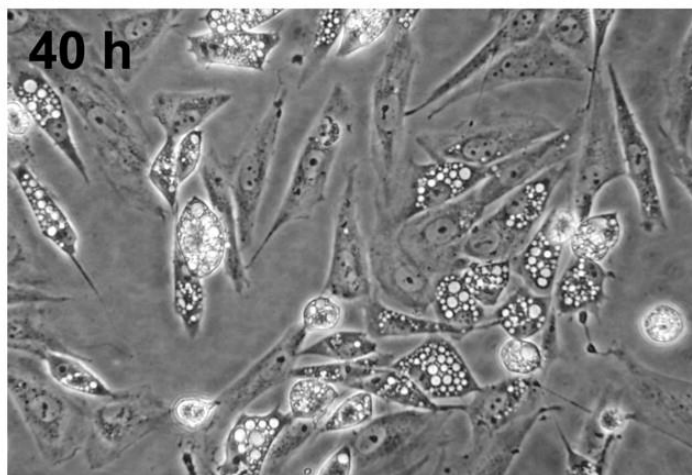
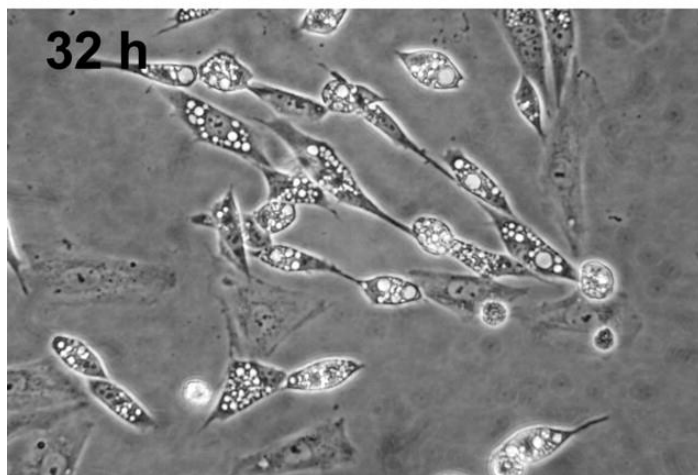
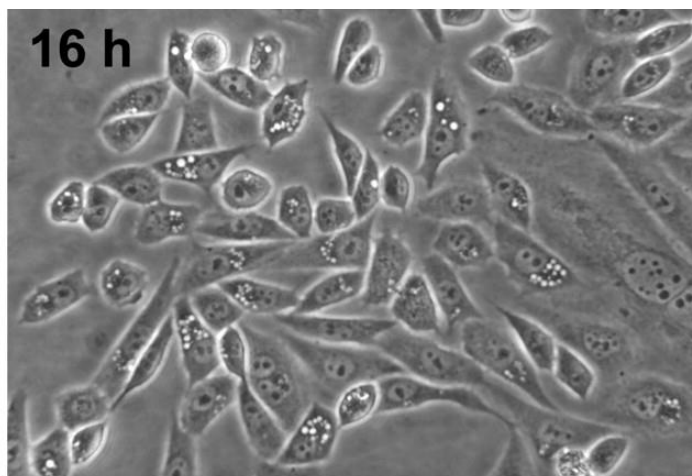
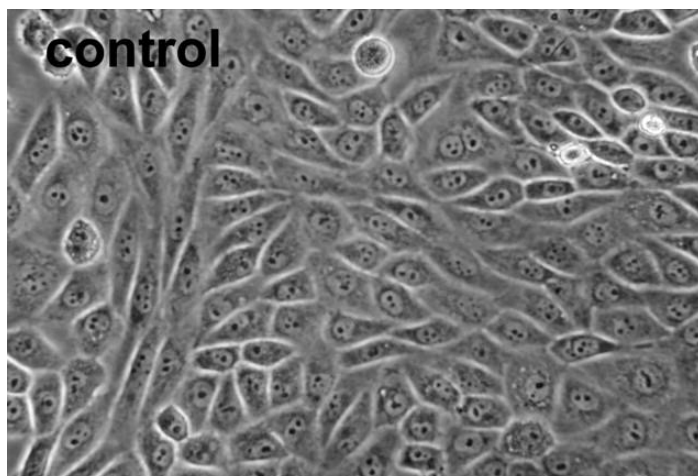
Цитопатогенное действие (ЦПД),
внутриклеточные включения (тельца),
феномен гемадсорбции,
«негативные колонии»,
«цветная проба»



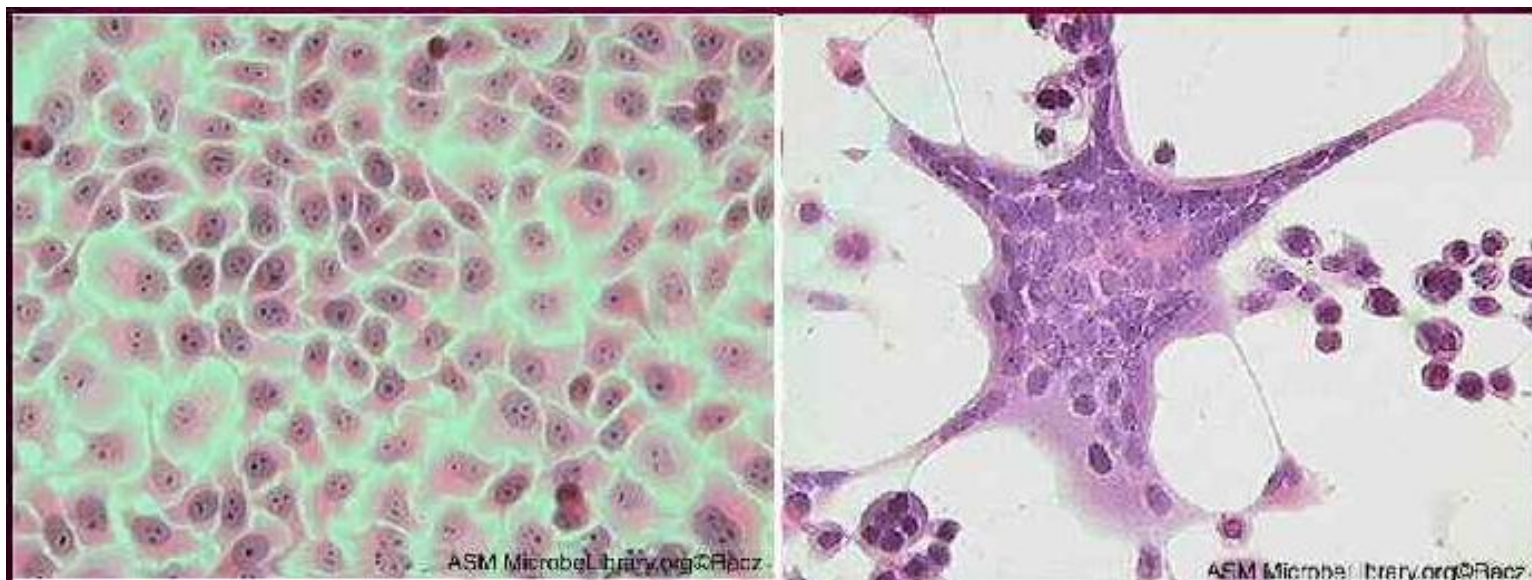
Цитопатогенное действие (ЦПД)

- ▶ 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

Цитопатогенное действие

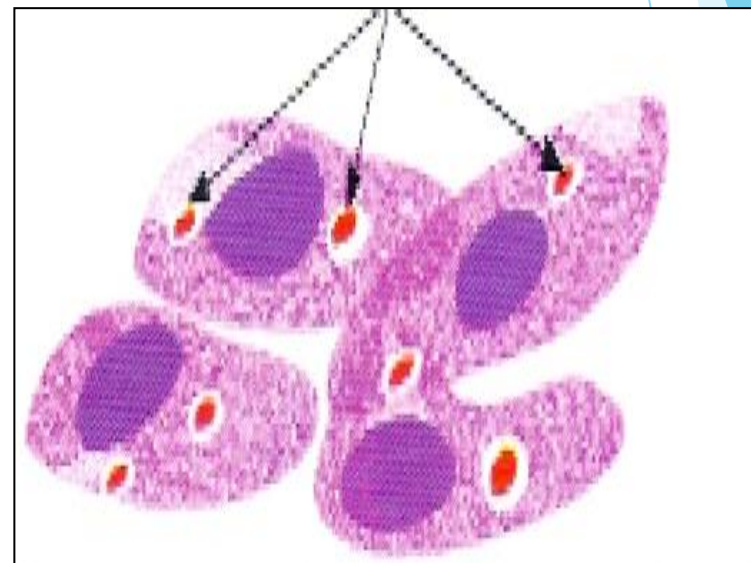


ЦПД вируса простого герпеса



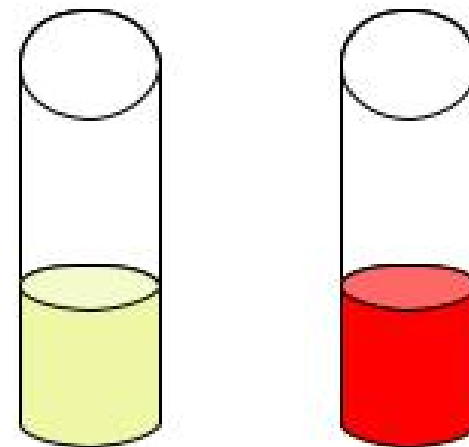
Внутриклеточные включения

- ▶ Некоторые вирусы можно обнаружить и идентифицировать по внутриклеточным 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.



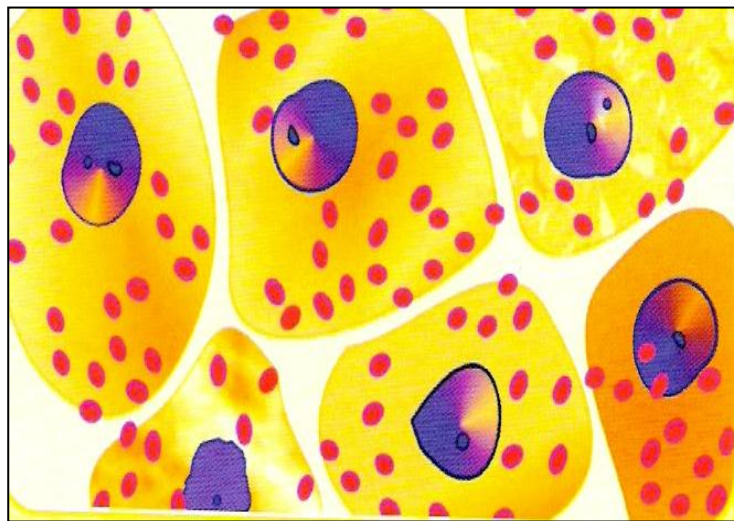
«Цветная проба»

- ▶ 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.



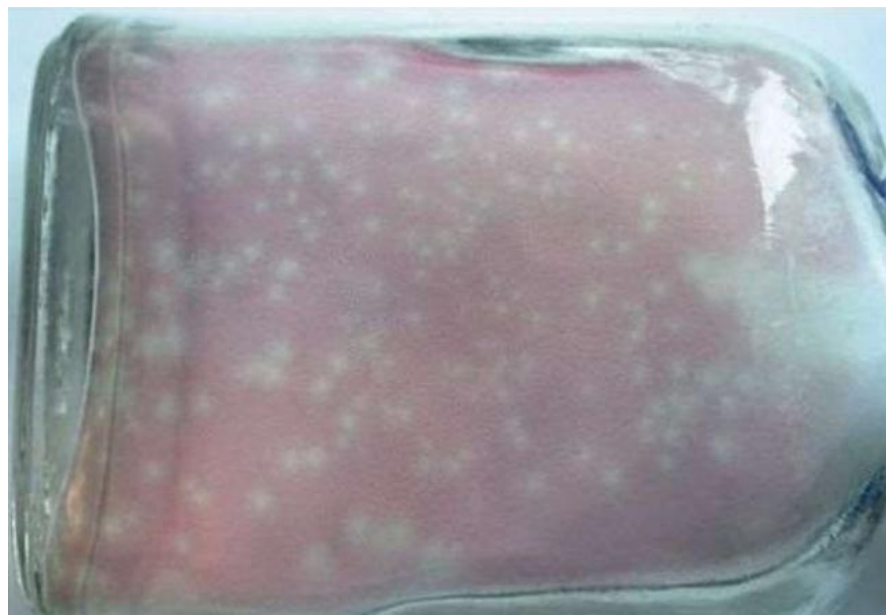
Феномен гемадсорбции

- ▶ *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.

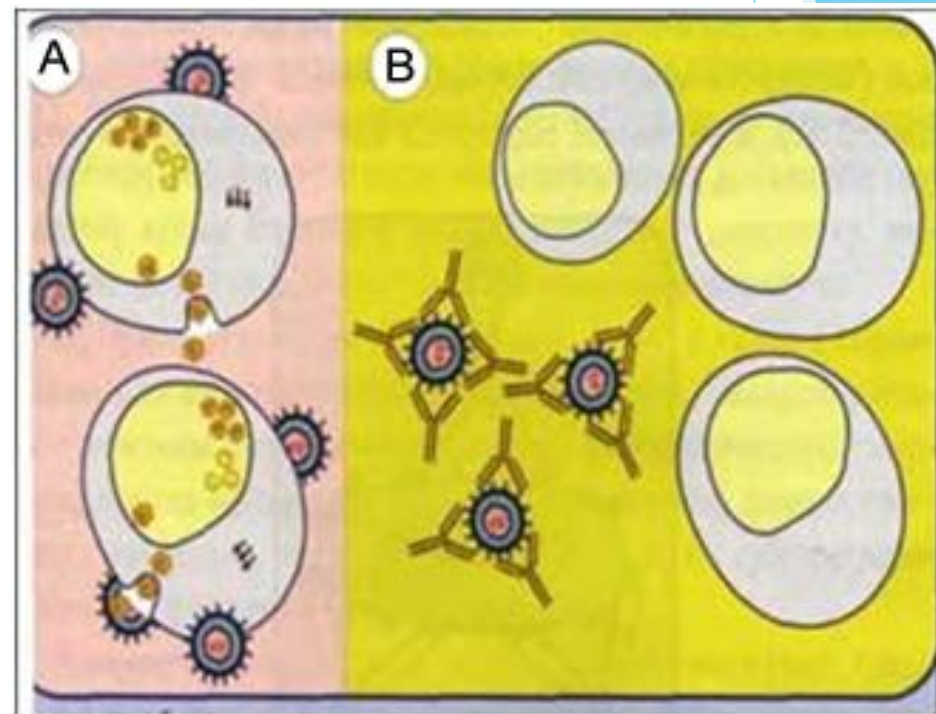


Феномен интерференции

- ▶ 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)-РБН 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.



Серологическая диагностика вирусных инфекций

- ▶ Обнаружение в биологических жидкостях пациентов (крови, спинномозговой жидкости) антител к антигенным детерминантам вирусов.
- ▶ Однократно проведенное серологическое исследование лишь в редких случаях позволяет диагностировать вирусное заболевание (например, при ВИЧ-инфекции).
- ▶ большинстве случаев для серологической диагностики требуются парные сыворотки, взятые в острой фазе заболевания и спустя 2–4 недели.
- ▶ *Обнаружение четырехкратного и более повышения титра антител принято рассматривать в качестве диагностического признака острой вирусной инфекции*



Молекулярно-биологические методы индикации, идентификации вирусов

- ▶ Обнаружение вирусспецифических фрагментов генома вирусов в биологическом материале от больного и культуре клеток.
- ▶ Молекулярно-биологическая индикация вирусов в биологическом материале (дот блоттинг, *in situ* гибридизация, сэндвич гибридизация):
 - ▶ – методы молекулярной гибридизации (метод микрогенов) — проводятся с целью выявления вирусспецифических фрагментов генома вируса в материале; характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью; используются для выявления цитомегаловирусов, вирусов герпеса, вирусов гепатита;
 - ▶ – полимеразная цепная реакция (ПЦР) и количественная ПЦР;
 - ▶ – вестерн-блоттинг — основан на выявлении циркулирующих в крови специфических антител к антигенам вируса;
 - ▶ – определение инфицированных вирусом клеток методом проточной цитофлюориметрии — используется при ВИЧ-инфекции, инфекционном мононуклеозе, гепатите С, цитомегаловирусной инфекции.
- ▶ Методом ПЦР возможно проведение индикации вирусов в материале, идентификации и дифференциации с родственными инфекционными агентами, генотипирование изолятов вирусов и клонирование фрагментов их генома без необходимости культивирования в культуре клеток.