Реферат:

**Общая вирусология. Классификация, структура и особенности биологии вирусов. Бактериофаги**

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

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

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

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

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

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

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

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

3.Вирусы не способны к росту и бинарному делению.

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

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

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

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

Строение (морфология) вирусов.

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

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

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

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

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

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

Основные этапы взаимодействия вируса с клеткой хозяина.

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

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

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

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

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

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

Исходы взаимодействия вирусов с клеткой хозяина.

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

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

- при инфицировании вирусом генетически нечувствительных к нему клеток;

- при заражении чувствительных клеток вирусом в неразрешающих условиях.

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

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

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

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

Основные методы культивирования вирусов.

1.В организме лабораторных животных.

2.В куриных эмбрионах.

3.В клеточных культурах - основной метод.

Типы клеточных культур.

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

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

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

Специальные питательные среды для культур клеток.

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

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

Выявляемые проявления вирусной инфекции клеточных культур.

1.Цитопатический эффект.

2.Выявление телец включений.

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

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

5.Выявление гемагглютинина вирусов- гемадсорбция, гемагглютинация.

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

Номенклатура вирусов.

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

*Вирусы бактерий (бактериофаги).*

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

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

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

Основные этапы взаимодействия фагов и бактерий.

1.Адсорбция (взаимодействие специфических рецепторов).

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

3.Репродукция фага.

4.Выход дочерних популяций.

Основные свойства фагов.

Различают *вирулентные фаги*, способные вызвать продуктивную форму процесса, и *умеренные фаги*, вызывающие редуктивную фаговую инфекцию (редукцию фага). В последнем случае геном фага в клетке не не реплицируется, а внедряется (интегрируется) в хромосому клетки хозяина (ДНК в ДНК), фаг превращается в *профаг.* Этот процесс получил название *лизогении*. Если в результате внедрения фага в хромосому бактериальной клетки она приобретает новые наследуемые признаки, такую форму изменчивости бактерий называют *лизогенной (фаговой) конверсией.* Бактериальную клетку, несущую в своем геноме профаг, называют лизогенной, поскольку профаг при нарушении синтеза особого белка- репрессора может перейти в литический цикл развития, вызвать продуктивную инфекцию с лизисом бактерии.

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

По спектру действия на бактерии фаги разделяют на :

- поливалентные (лизируют близкородственные бактерии, например сальмонеллы);

- моновалентные (лизируют бактерии одного вида);

- типоспецифические (лизируют только определенные фаговары возбудителя).

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

Практическое использование бактериофагов.

1.Для идентификации (определение фаготипа).

2.Для фагопрофилактики (купирование вспышек).

3.Для фаготерапии (лечение дисбактериозов).

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

**Генетика бактерий и вирусов**.

Молекулярная биология, изучающая фундаментальные основы жизни, является в значительной степени детищем микробиологии. В качестве основных объектов изучения в ней используют вирусы и бактерии, а основное направление- молекулярная генетика основана на генетике бактерий и фагов.

Бактерии- удобный материал для генетики. Их отличает:

- относительная простота *генома* (сопокупности нуклеотидов хромосом);

- *гаплоидность* (один набор генов), исключающая доминантность признаков;

*-* различные интегрированные в хромосомы и обособленные *фрагменты ДНК*;

- половая дифференциация в виде донорских и реципиентных клеток;

- легкость культивирования, быстрота накопления биомасс.

Общие представления о генетике.

*Ген-* уникальная структурная единица наследственности, носитель и хранитель жизни. Он имеет *три фундаментальные функции*.

1.*Непрерывность наследственности*- обеспечивается механизмом *репликации* ДНК.

2.*Управление структурами и функциями организма* - обеспечивается с помощью единого *генетического кода* из четырех оснований (А- аденин, Т- тимин, Г- гуанин, Ц- цитозин). Код триплетный, поскольку *кодон*- функциональная единица, кодирующая аминокислоту, состоит из трех оснований (букв).

3.*Эволюция организмов-* благодаря *мутациям и генетическим рекомбинациям.*

В узкоспециальном плане ген чаще всего представляет структурную единицу ДНК, расположение кодонов в которой детерминирует первичную структуру соответствующей полипептидной цепи (белка). Хромосома состоит из особых функциональных единиц- *оперонов.*

Основные этапы развития (усложнения) генетической системы можно представить в виде следующей схемы:

кодон 🡪 ген 🡪 оперон 🡪 геном вирусов и плазмид 🡪 хромосома прокариот (нуклеоид) 🡪 хромосомы эукариот (ядро).

Генетический материал бактерий.

1.*Ядерные структуры бактерий*- хроматиновые тельца или нуклеоиды (хромосомная ДНК). У бактерий одна замкнутая кольцевидная хромосома (до 4 тысяч отдельных генов). Бактериальная клетка гаплоидна, а удвоение хромосомы (репликация ДНК) сопровождается делением клетки. Вегетативная репликация хромосомной (и плазмидной) ДНК обусловливает передачу генетической информации по вертикали- от родительской клетки- к дочерней. Передача генетической информации по горизонтали осуществляется различными механизмами- в результате *конъюгации, трансдукции, трансформации, сексдукции.*

*2.Внехромосомные молекулы ДНК* представлены *плазмидами, мигрирующими генетическими элементами- транспозонами и инсервационными (вставочными) или IS- последовательностями.*

Плазмиды- экстрахромосомный генетический материал (ДНК), более просто устроенные по сравнению с вирусами организмы, наделяющие бактерии *дополнительными полезными свойствами.* По молекулярной массе плазмиды значительно меньше хромосомной ДНК, содержат от 40 до 50 генов.

*Их* объединение в одно царство жизни с вирусами связано с наличием ряда общих свойств- отсутствием собственных систем мобилизации энергии и синтеза белка, саморепликацией генома, абсолютным внутриклеточным паразитизмом.

Их *выделение в отдельный класс* определяется существенными отличиями от вирусов.

1.Среда их обитания- только бактерии (среди вирусов , кроме вирусов бактерий- бактериофагов имеются вирусы растений и животных).

2.Плазмиды сосуществуют с бактериями, наделяя их дополнительными свойствами. У вирусов эти свойства могут быть только у умеренных фагов при лизогении бактерий, чаще же всего вирусы вызывают отрицательный последствия, лизис клеток.

3.Геном представлен двунитевой ДНК.

4.Плазмиды представляют собой “голые” геномы, не имеющие никакой оболочки, их репликация не требует синтеза структурных белков и процессов самосборки.

Плазмиды могут распространяться по вертикали (при клеточном делении) и по горизонтали, прежде всего путем конъюгационного переноса. В зависимости от наличия или отсутствия механизма самопереноса (его контролируют гены tra- оперона) выделяют *конъюгативные и неконъюгативные плазмиды.* Плазмиды могут встраиваться в хромосому бактерий- *интегративные плазмиды* или находиться в виде отдельной структуры- автономные плазмиды ( *эписомы*).

Классификация и биологическая роль плазмид.

*Функциональная классификация плазмид* основана на свойствах, которыми они наделяют бактерии. Среди них- способность продуцировать экзотоксины и ферменты, устойчивость к лекарственным препаратам, синтез бактериоцинов.

Основные категории плазмид.

1.F- плазмиды - донорские функции, индуцируют деление (от fertility - плодовитость). Интегрированные F - плазмиды- Hfr- плазмиды (высокой частоты рекомбинаций).

2.R- плазмиды (resistance) - устойчивость к лекарственным препаратам.

3.Col- плазмиды- синтез колицинов (бактериоцинов)- факторов конкуренции близкородственных бактерий (антогонизм). На этом свойстве основано колицинотипирование штаммов.

4.Hly- плазмиды- синтез гемолизинов.

5.Ent- плазмиды- синтез энтеротоксинов.

6.Tox- плазмиды- токсинообразование.

Близкородственные плазмиды не способны стабильно сосуществовать, что позволило объединить их по степени родства в Inc- группы (incompatibility- несовместимость).

Биологическая роль плазмид многообразна, в том числе:

- контроль генетического обмена бактерий;

- контроль синтеза факторов патогенности;

- совершенствование защиты бактерий.

Бактерии для плазмид- среда обитания, плазмиды для них- переносимые между ними дополнительные геномы с наборами генов, благоприятствующих сохранению бактерий в природе.

Мигрирующие генетические элементы - отдельные участки ДНК, способные определять свой перенос между хромосомами или хромосомой и плазмидой с помощью фермента рекомбинации *транспозазы*. Простейшим их типом являются *инсерционные последовательности (IS- элементы) или вставочные элементы*, несущие только один ген транспозазы, с помощью которой IS- элементы могут встраиваться в различные участки хромосомы. Их функции- координация взаимодействия плазмид, умеренных фагов, транспозонов и генофора для обеспечения репродукции, регуляция активности генов, индукция мутаций. Величина IS- элементов не превышает 1500 пар оснований.

*Транспозоны (Tn- элементы)* включают до 25 тысяч пар нуклеотидов, содержат фрагмент ДНК, несущий специфические гены, и два Is- элемента. Каждый транспозон содержит гены, привносящие важные для бактерии характеристики, как и плазмиды (множественная устойчивость к антибиотикам, токсинообразование и т.д.). Транспозоны- самоинтегрирующиеся фрагменты ДНК, могут встраиваться и перемещаться среди хромосом, плазмид, умеренных фагов, т.е. обладают потенциальной способностью распространяться среди различных видов бактерий.

Понятие о генотипе и фенотипе.

*Генотип-* вся совокупность имеющихся у организма генов.

*Фенотип*- совокупность реализованных (т.е. внешних) генетически детерминированных признаков, т.е. индивидуальное (в определенных условиях внешней среды) проявление генотипа. При изменении условий существования фенотип бактерий изменяется при сохранении генотипа.

*Изменчивость у бактерий* может быть ненаследуемой (*модификационной)* и генотипической (*мутации, рекомбинации).*

Временные, наследственно не закрепленные изменения, возникающие как адаптивные реакции бактерий на изменения окружающей среды, называются *модификациями* (чаще - морфологические и биохимические модификации). После устранения причины бактерии реверсируют к исходному фенотипу.

Стандартное проявление модификации- распределение однородной популяции на две или более двух типов- *диссоциация.* Пример- характер роста на питательных средах: S- (гладкие) колонии, R- (шероховатые) колонии, M- (мукоидные, слизистые) колонии, D- (карликовые) колонии. Диссоциация протекает обычно в направлении S🡪 R. Диссоциация сопровождается изменениями биохимических, морфологических, антигенных и вирулентных свойств возбудителей.

*Мутации*- скачкообразные изменения наследственного признака. Могут быть спонтанные и индуцированные, генные (изменения одного гена) и хромосомные (изменения двух или более двух участков хромосомы).

Одновременно у бактерий имеются различные механизмы *репарации мутаций*, в том числе с использованием ферментов- эндонуклеаз, лигаз, ДНК- полимеразы.

*Генетические рекомбинации-* изменчивость, связанная с обменом генетической информации. Генетические рекомбинации могут осуществляться путем *трансформации, трансдукции, конъюгации, слияния протопластов.*

1.Трансформация- захват и поглощение фрагментов чужой ДНК и образование на этой основе рекомбинанта.

2.Трансдукция- перенос генетического материала фагами (умеренными фагами- специфическая трансдукция).

3.Конъюгация- при непосредственном контакте клеток. Контролируется tra (transfer) опероном. Главную роль играют конъюгативные F- плазмиды.

Генетика вирусов.

Геном вирусов содержит или РНК, или ДНК (РНК- и ДНК- вирусы соответственно). Выделяют позитивную (+) РНК, обладающую матричной активностью и соответственно- инфекционными свойствами, и негативную ( - ) РНК, не проявляющую инфекционные свойства, которая для воспроизводства толжна *транскрибироваться* (превращаться) в +РНК. Механизмы репродукции различных вирусов очень сложные и существенно отличаются. Основные их схематические варианты представлены ниже.

1. вирионная (матричная) +РНК 🡪 комплементарная -РНК (в рибосомах) 🡪 вирионная +РНК.

2. - РНК 🡪 вирусная (информационная) +РНК 🡪 - РНК (формируется на геноме зараженной клетки).

3. однонитевая ДНК: +ДНК 🡪 +ДНК -ДНК 🡪 +ДНК -ДНК +ДНК 🡪 +ДНК.

4. ретровирусная однонитевая РНК: РНК 🡪 ДНК (провирус) 🡪 РНК.

5. двунитевая ДНК: разделение нитей ДНК и формирование на каждой комплементарной нити ДНК.

Генофонд вирусов создается и пополняется из четырех основных источников:

двух внутренних (мутации, рекомбинации) и двух внешних (включение в геном генетического материала клетки хозяина, поток генов из других вирусных популяций).

*Комплементация*- функциональное взаимодействие двух дефектных вирусов, способствующее их репликации и горизонтальной передаче.

*Фенотипическое смешивание*- при заражении клетки близкородственными вирусами с образованием вирионов с гибридными капсидами, кодируемыми геномами двух вирусов.

*Популяционная изменчивость* вирусов связана с двумя разнонаправленными процессами - мутациями и селекцией, связанными с внешней средой как индуктором мутаций и фактором стабилизирующего отбора. Гетерогенность вирусных популяций- адаптационный генетический механизм, способствующий пластичности (устойчивости, приспособляемости) популяций, фактор эволюции и сохранения видов во внешней среде.

Генофонд вирусных популяций сохраняется за счет нескольких механизмов:

- восстановления изменчивости за счет мутаций;

- резервирующих механизмов (возможность перехода любых, даже негативных мутаций в следующую генерацию)- комплементация, рекомбинация;

- буферных механизмов (образование дефектных вирусных частиц, иммунных комплексов и др.), способствующие сохранению вируса в изменяющихся внешних условиях.

Литература:

1. Паттерсон Р.Р. «Аллергические болезни», 2000.
2. Петров Р.В. «Иммунология», в 2-х томах, 1987.
3. Петров Р.В., Хасетов Р.М. «Искусственные антигены и вакцины», 1988.
4. Петров Р.В., Хасетов Р.М. «Вакцины нового поколения»// «Иммунология», №5, 1998.
5. Плейфер Дж. «Наглядная иммунология», 1994.