

Министерство образования Республики Беларусь

Учреждение образования  
«Гомельский государственный университет  
имени Франциска Скорины»

Л. В. ШЕВЦОВА

**ВИРУСОЛОГИЯ**

практическое пособие  
для студентов 3 курса  
специальности 1—31 01 01 02 «Биология»

В 2 частях

Часть 1

Гомель 2010

УДК 578 (075.8)  
ББК 28.3я73  
Ш 378

**Рецензенты:** Н. М. Дайнеко, кандидат биологических наук, заведующий кафедрой ботаники и физиологии растений; Л. А. Евтухова, кандидат биологических наук, заведующая кафедрой физиологии человека и животных

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

Шевцова, Л. В.  
Ш 378 Вирусология: практическое пособие для студентов 3 курса специальности 1—31 01 01 02 «Биология» (научно-педагогическая деятельность): в 2 частях. Ч. 1 / Л. В. Шевцова; Мн-во образования РБ. — Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины, 2010. — с.  
ISBN

Практическое пособие ставит своей целью повышение уровня усвоения достаточно сложного материала по разделам «Строение вирусных частиц и функции их отдельных структур», «Основные семейства вирусов животных и растений», «Организация геномов вирусов и особенности их репликации» и адресовано для использования студентами 3 курса специальности 1 — 31 01 01 02 «Биология» (научно-педагогическая деятельность) как на занятиях по соответствующим темам курса «Вирусология», так и для самостоятельной подготовки.

УДК 578. (075.8)  
ББК 28.3я73

ISBN

© Шевцова Л.В., 2010  
© УО «ГГУ им. Ф.Скорины», 2010

## Содержание

Введение .....	4
<i>Тема 1</i> Строение вирусных частиц и функции отдельных их структур .....	6
Лабораторное занятие 1 Морфология и ультраструктура вирусов .....	12
<i>Тема 2</i> Принципы классификации вирусов животных, человека и растений .....	19
Лабораторное занятие 2 Основные семейства вирусов животных и растений .....	39
Лабораторное занятие 3 Методы выделения, культивирования и идентификации вирусов .....	40
<i>Тема 3</i> Организация геномов вирусов и особенности их репликации .....	42
Лабораторное занятие 4 Организация геномов вирусов и выражение вирусного генома при репродукции вирусов .....	51
<i>Тема 4</i> Взаимодействие вирусов с клеткой -хозяином .....	52
Лабораторное занятие 5 Взаимодействие вирусов с клеткой -хозяином .....	56
Литература .....	58

## Введение

Вирусология занимает одно из центральных мест среди медико-биологических наук. Бурное развитие ее в последние два десятилетия обусловлено следующими факторами. Во-первых, вирусные болезни имеют ведущее значение в инфекционной патологии человека. Во-вторых, в настоящее время получила признание вирусная теория этиологии рака, лейкозов и других злокачественных новообразований. В-третьих, на основании изучения природы вирусов и взаимодействия их с клетками хозяев в настоящее время решаются фундаментальные проблемы биологии: раскрытие природы генетического кода, механизмов синтеза нуклеиновых кислот и белков, химического мутагенеза. В-четвертых, вирусы являются особой категорией органической материи, отличающейся от животного и растительного царства. Поэтому в настоящее время изучение разных форм органического мира невозможно без изучения вирусов.

В переводе с латинского *virus* означает «яд, ядовитое начало». До конца 19 в. термин «вирус» использовался для обозначения любого инфекционного агента, вызывающего заболевание. Открытое Д. И. Ивановским (1892) «фильтрующееся ядовитое начало», вызывающее табачную мозаику, М. Бейеринк назвал «фильтрующимся вирусом». Этот термин постепенно сократился до одного слова – «вирус».

Основные свойства вирусов, по которым они отличаются от всех остальных живых существ:

- имеют ультрамикроскопические размеры;
- они не имеют клеточного строения;
- содержат нуклеиновую кислоту только одного типа – или ДНК, или РНК. Все другие организмы содержат нуклеиновые кислоты обоих типов, геном у них представлен только ДНК;
- геном у подавляющего большинства вирусов гаплоидный;
- у вирусов отсутствуют собственные системы мобилизации энергии;
- у вирусов нет собственных белоксинтезирующих систем;
- вирусы не способны к росту и бинарному делению. Они размножаются *путем воспроизведения* себя из собственной геномной нуклеиновой кислоты, т. е. вирусы образуются в виде зрелых форм (вирионов) путем самосборки из готовых (преформированных) компонентов. Размножение всех прочих организмов включает стадии бинарного деления клеток;
- репликация вирусов происходит в клетках хозяина с использованием белоксинтезирующих и энергетических систем последних. Поэтому вирусы – абсолютные (облигатные) внутриклеточные паразиты.

В настоящее время известны вирусы бактерий (бактериофаги), актиномицетов, грибов, растений и животных. Вирусы – разнообразная и гетерогенная группа микроорганизмов. Их рассматривают не только как этиологический агент определенных инфекционных заболеваний, но и как один

из факторов эволюции всех живых организмов. При этом вирусы являются уникальной эволюционной системой, обладающей необычайно высокой изменчивостью. Популяции вирионов в инфицированном организме человека достигают до  $10^{13}$  в  $1 \text{ см}^3$  плазмы крови. Генетический дрейф, обусловленный заменой нуклеотидных последовательностей, выявляется значительно чаще, чем в геноме у клеток хозяев. Рекомбинационный процесс отдельных фрагментов геномов разных вирусов приводит к формированию новых вариантов, видов и семейств вирусов. В вирусологии все больше внимания обращается на изучение биологических процессов коэволюции вирусов с их хозяевами.

Вирусология изучает морфологию, строение, экологию, генетику, молекулярную биологию вирусов, процессы их репликации, направление и механизмы эволюции; эпидемиологию, методы лабораторной диагностики, профилактики и лечения вызываемых ими заболеваний.

Если в прошлое столетие наблюдался прогресс в контроле за вирусными инфекциями (ликвидировано одно из наиболее опасных заболеваний – оспа, получены вакцины против полиомиелита, кори и др.), то настоящее время в развитии вирусологии может рассматриваться как постгеномный период. Ряд новых направлений постгеномного периода получили дополнительный суффикс «-омика», например, геномика, транскриптомика, протеомика.

Геномика изучает структурно-функциональные межгенные взаимосвязи в процессах физиологической и патологической экспрессии генома. Она используется для идентификации, таксономии, изучения процессов эволюции генов и микроорганизмов.

Транскриптомика изучает способы, механизмы и закономерности транскрипции генов, разрабатывает методы и препараты для ее регуляции и практического использования.

Протеомика изучает структурно-функциональные взаимосвязи и проводит анализ закономерностей биосинтеза отдельных вирусных и клеточных белков, белок-белковых взаимодействий и изменений в процессах инфекции или лечения.

## Тема 1 Строение вирусных частиц и функции их отдельных структур

1.1 Структура вирусных частиц

1.2 Оболочки вирионов

1.3 Типы симметрии

1.4 Функции структурных компонентов вирусных частиц

### 1.1 Структура вирусных частиц

Вирусы – это мельчайшие живые организмы:

- их размеры варьируют в пределах примерно от 20 до 300 нм (в среднем они в пятьдесят раз меньше бактерий);
- вирусы нельзя увидеть с помощью светового микроскопа, так как их размеры меньше полудлины световой волны. Для изучения морфологии и структуры вирусов используют электронные микроскопы;
- вирусы проходят через фильтры, которые задерживают бактериальные клетки.

Среди вирусов имеются крупные виды (рисунки 1, 2). Например, вирус натуральной оспы достигает 400 нм. Вирус коревой оспы, имеет такие же размеры, как и наиболее мелкие бактерии (хламидии и риккетсии), которые тоже являются облигатными паразитами и размножаются только в живых клетках.

По морфологии выделяют вирусы палочковидные (возбудитель лихорадки Эбола), пулевидные (вирус бешенства), сферические (герпесвирусы), овальные (вирус оспы), а также бактериофаги, имеющие сложную форму (имеют головку и хвостик).

Различают две формы существования вирусов. Внеклеточная форма – *вирион* – включает в себя все составные элементы (капсид, нуклеиновую кислоту, структурные белки, ферменты и др.). Внутриклеточная форма – *вирус* – может быть представлена лишь одной молекулой нуклеиновой кислоты, так как, попадая в клетку, вирион распадается на составные элементы.

По строению различают два типа вирусных частиц: простые и сложные. *Простые* («голые») *вирусы* состоят из сердцевины и белковой оболочки – капсида. *Сложные* («одетые») *вирусы* имеют дополнительную липопротеидную оболочку – суперкапсид или пеплос.

Внутренняя структура простых и сложных вирусов сходна.

*Серцевина* вируса – вирусная нуклеиновая кислота (ДНК либо РНК) – вирусный геном. Наиболее простой вирусный геном кодирует 3-4 белка, наиболее сложный – более 50 полипептидов.

Снаружи нуклеиновая кислота покрыта белковым чехлом – капсидом, образуя комплекс – *нуклеокапсид*, по химической природе представляющий собой нуклеопротеид.

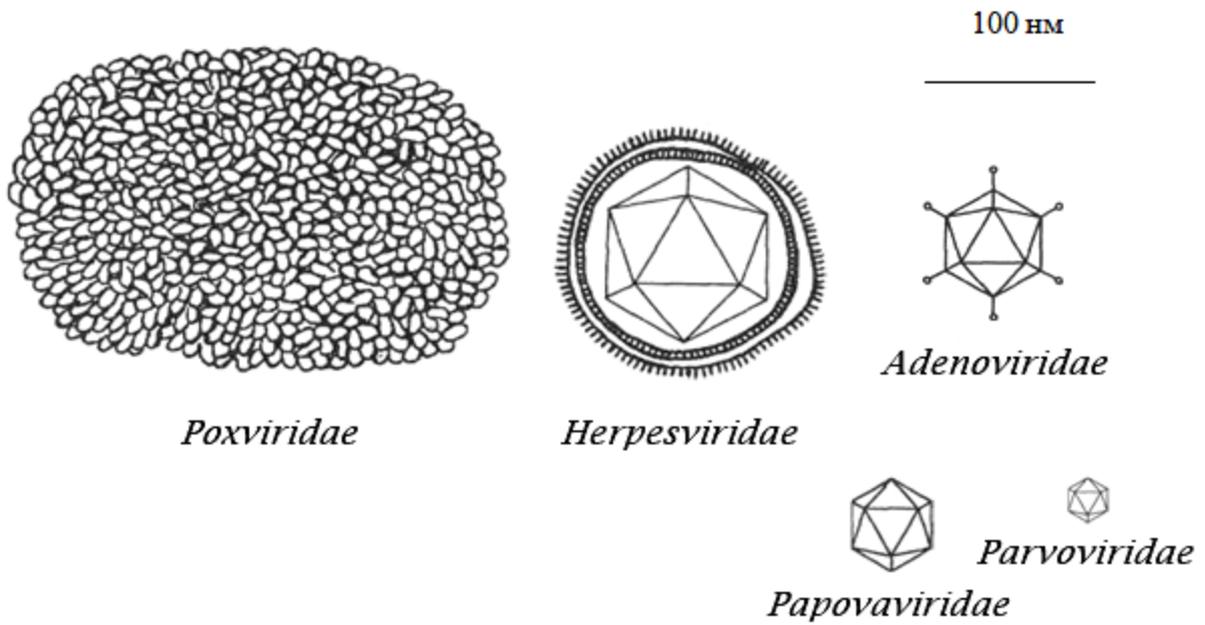


Рисунок 1 – Форма и относительные размеры вирионов некоторых семейств ДНК-содержащих вирусов животных

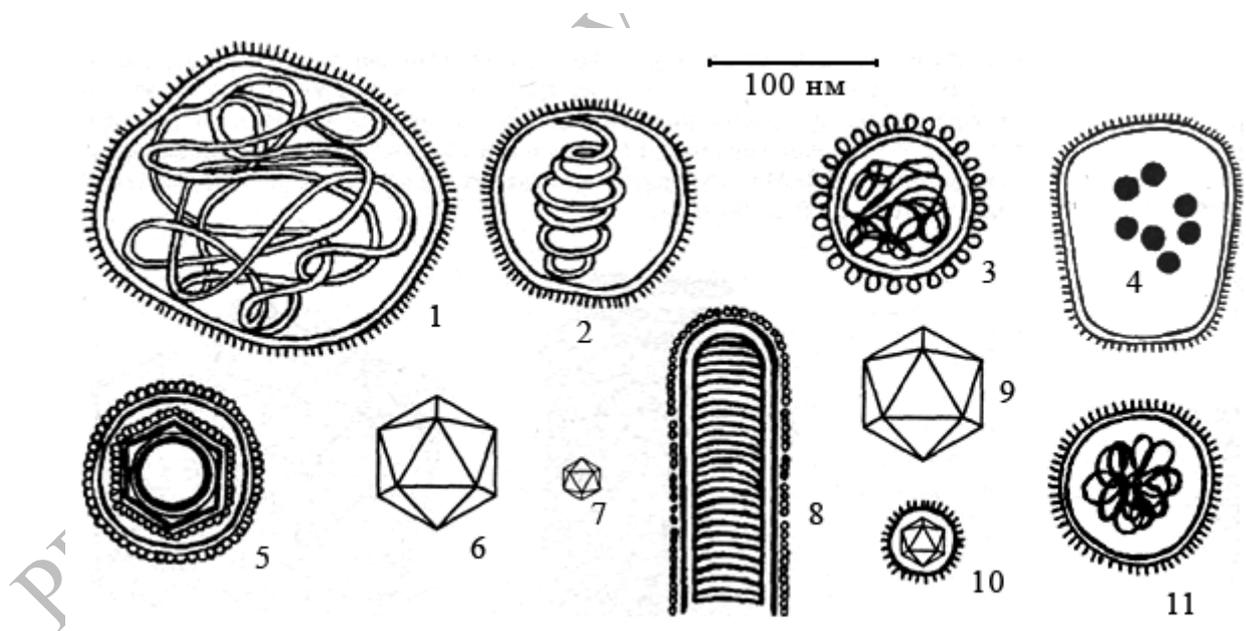


Рисунок 2 – Форма и относительные размеры вирионов некоторых семейств РНК-содержащих вирусов животных:

1 – *Paramyxoviridae*; 2 – *Orthomyxoviridae*; 3 – *Coronaviridae*; 4 – *Arenaviridae*; 5 – *Retroviridae*; 6 – *Reoviridae*; 7 – *Picornaviridae*; 8 – *Rhabdoviridae*; 9 – *Orbiviridae*; 10 – *Togaviridae*; 11 – *Bunyaviridae*

## 1.2 Оболочки вирионов

*Капсид* (лат. *capsa*, ящик) часто построен из повторяющихся субъединиц – капсомеров. *Капсомеры* являются морфологическими единицами вирусов (рисунок 3). Число капсомеров строго специфично для каждого вида и зависит от размеров и морфологии вирионов. Например, вирус полиомиелита содержит 32 капсомера, а аденовирус – 252.

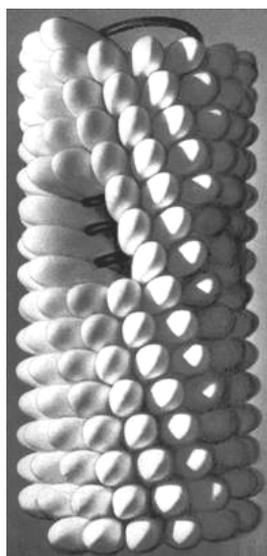


Рисунок 3 – Модели вирусных частиц. Часть палочки вируса мозаичной болезни табака; видны капсомеры и инкрустированные в них витки нуклеиновой кислоты.

Капсомеры состоят из молекул белка – *протомеров*. Протомеры – это структурные единицы капсомера. Протомеры могут быть мономерными (содержать один полипептид) либо полимерными (включать несколько полипептидов). Капсид простых вирусов представлен  $\alpha$ -спиральными белками.

Основные функции капсида – защита вирусного генома от внешних воздействий, обеспечение адсорбции вириона к клетке, проникновение его в клетку путём взаимодействия с клеточными рецепторами. Белки капсида обладают антигенными свойствами.

Комплекс капсида и вирусного генома называют *нуклеокапсидом*.

Дополнительная оболочка сложных вирусов – *суперкапсид* образован из плазматической мембраны клетки-хозяина. Суперкапсид встречается только у сравнительно крупных вирусов (грипп, герпес) и выполняет защитную функцию. В составе суперкапсида выделяют внутренний белковый слой (М-белок), внешний объемный слой липидов и углеводов (компонентов мембран клетки-хозяина) и поверхностные гликопротеиды.

Вирусспецифические гликопротеиды встраиваются в липидный бислой, образуя разные по форме выпячивания, например, шипы.

### 1.3 Типы симметрии вирусов

Капсомеры вириона организованы в один или два слоя по двум типам симметрии – *кубическому* или *спиральному* (рисунок 4). Симметричность капсида связана с тем, что для упаковки генома требуется большое количество капсомеров, а компактное их соединение возможно лишь при условии симметричного расположения субъединиц. Формирование капсида напоминает процесс кристаллизации и протекает по принципу самосборки.

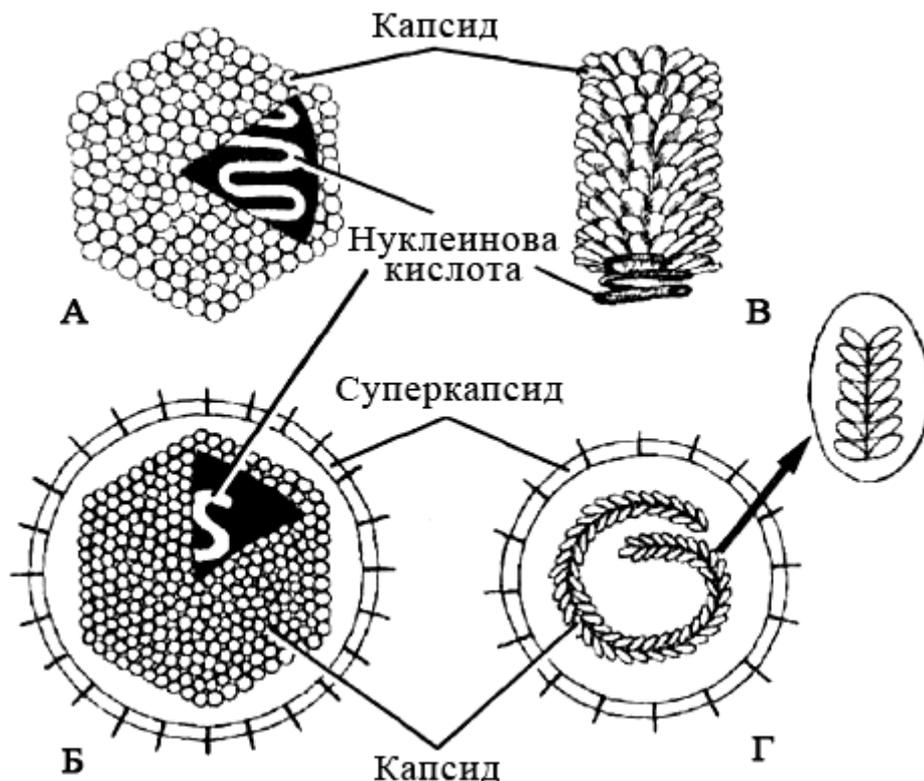


Рисунок 4 – Основные типы симметрии вирусов:

А – кубический («голый» вирион); Б – кубический («одетый» вирион); В – спиральный («голый» вирион); Г – спиральный («одетый» вирион)

**Спиральная симметрия.** В нуклеокапсиде взаимодействие нуклеиновой кислоты и белка осуществляется по одной оси вращения. Каждый вирус со спиральной симметрией обладает характерной длиной, шириной и периодичностью нуклеокапсида. Нуклеокапсиды большинства патогенных для человека вирусов имеют спиральную симметрию. К этой группе относят и вирус табачной мозаики (рисунок 5), капсид которого образован 2130 одинаковыми белковыми субъединицами. *Организация по принципу спиральной симметрии придаёт вирусам палочковидную*

*форму.* При спиральной симметрии белковый чехол лучше защищает наследственную информацию, но требует большого количества белка, так как покрытие состоит из сравнительно крупных блоков.

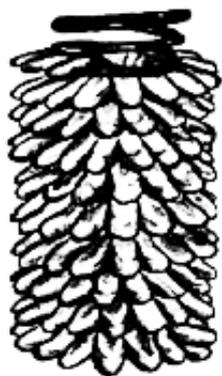


Рисунок 5 – Вирус табачной мозаики (спиральный тип симметрии)

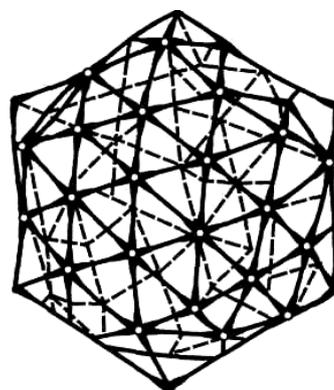


Рисунок 6 – Один из возможных вариантов кубической симметрии



Рисунок 7 – Бактериофаг (смешанный тип симметрии)

**Кубическая симметрия.** У подобных вирусов нуклеиновая кислота окружена капсомерами, образующими фигуру *икосаэдра* – многогранника с 12 вершинами, 20 треугольными гранями и 30 углами (рисунок 6). *Организация по принципу кубической симметрии придаёт вирусам сферическую форму.* Принцип кубической симметрии – самый экономичный для формирования замкнутого капсида, так как для его организации используются сравнительно небольшие белковые блоки, образующие большое внутреннее пространство, в которое свободно укладывается нуклеиновая кислота.

**Двойная (смешанная) симметрия.** Некоторые бактериофаги (вирусы бактерий) имеют двойную симметрию: головка организована по принципу кубической симметрии, отросток – по принципу спиральной симметрии (рисунок 7).

**Отсутствие постоянной симметрии.** Для вирусов больших размеров (для поксвирусов) характерно отсутствие постоянной симметрии.

#### **1.4 Функции структурных компонентов вирусных частиц**

**Белки.** В состав нуклеокапсидов входят *внутренние белки*, обеспечивающие правильную упаковку генома, а также выполняют структурную и ферментативную функции.

Вирусные ферменты разделяют на вирионные и вирусиндуцированные. В капсидах могут присутствовать ферменты обеих групп.

*Вирионные ферменты* входят в состав вирионов и их также подразделяют на две функциональные группы:

- ферменты, обеспечивающие проникновение вирусных нуклеиновых кислот в клетку и выход дочерних популяций;
- ферменты, участвующие в транскрипции и репликации вирусного генома (например, обратная транскриптаза).

*Вирусиндуцированные ферменты* закодированы в вирусном геноме.

Поверхностные белки «голых» вирусов обеспечивают взаимодействие вирусов с клеточными рецепторами и последующее проникновение в клетку путём эндоцитоза. Суперкапсидные *гликопротеиды*, образующие шипы, распознают клеточные рецепторы и связываются с ними, обеспечивают слияние вирусной мембраны с мембраной клетки.

Большинство «одетых» вирусов имеют поверхностные специальные *F-белки* (лат. *fusio*, слияние), обеспечивающие слияние вирусных суперкапсидов и клеточных мембран.

*M-белки* – матричные белки формируют структурный слой на внутренней поверхности суперкапсида и способствуют взаимодействию его с белками нуклеокапсида, что важно на заключительных этапах самосборки вирионов.

**Липиды** суперкапсида стабилизируют структуры вирусов. Деградация или потеря липидов приводит к потере инфекционных свойств, так как такие вирусные частицы теряют стабильность своего состава и, соответственно, способность к заражению клеток. Состав липидов обычно зависит от характера «почкования» вирусной частицы. Например, у вируса гриппа состав липидного бислоя аналогичен таковому в клеточных мембранах. Герпесвирусы почкуются через ядерную мембрану, поэтому набор липидов суперкапсида отражает состав липидов ядерной мембраны.

#### **Вопросы для самоконтроля**

- 1 Дайте определение понятию «вирусы».
- 2 Какие формы существования различают у вирусов?
- 3 Какие свойства характеризуют вирусы как особое царство ультрамикроскопических организмов?
- 4 Какие размеры и форму имеют вирусные частицы?

- 5 Приведите примеры разных по морфологии вирусов.
- 6 Назовите структурные элементы простых и сложных вирусов?
- 7 Какую химическую природу имеют сердцевина, капсид и нуклеокапсид вириона?
- 8 Что является морфологической и структурной единицами капсида?
- 9 Что определяет способ укладки капсомеров в капсиде?
- 10 Какое происхождение имеет суперкапсид сложных вирусов?
- 11 Дайте характеристику кубическому, спиральному и смешанному типам симметрии и приведите примеры вирусов с этими типами симметрии.
- 12 Какие слои различают в ультраструктуре суперкапсида?
- 13 Какие функции выполняют капсид и суперкапсид?
- 14 Где в вирусной частице расположены М- и F-белки и какие функции они выполняют?
- 15 Дайте определение понятиям «вирионные» и «вирусиндуцированные» ферменты.
- 16 Назовите белковые структуры вирусной частицы и их функции.
- 17 Какая группа органических соединений образует поверхностные структуры суперкапсида?
- 18 Какие функции выполняют липиды вирусной частицы?

## Лабораторное занятие 1 Морфология и ультраструктура вирусов

*Цель занятия:* освоить бактериоскопический метод выявления вирусов в материалах и изучить особенности морфологии и ультраструктуры вирусов с использованием метода электронной микроскопии.

*Материалы и оборудование:* 1) электронные микрофотографии и демонстрационные рисунки: а) простых и сложных вирусов, б) вирусов с разными типами симметрии, в) вирусов с оболочками разной архитектуры; 2) световой микроскоп; 3) флюоресцентный микроскоп; 4) музейные препараты с вирусными включениями в клетках пораженных тканей растений и животных; 5) препарат или фотография флюоресцентной микроскопии препарата вирусинфицированных клеток.

*Задание 1:* проведите вирусоскопическое исследование демонстрационных препаратов клеток, пораженных вирусами.

*Ход работы*

1 Прочтите приведенное ниже краткое описание микроскопических методов, используемых для выявления вирусов в материалах (вирусоскопия в иммерсионном и люминесцентном микроскопах).

*Вирусоскопия.* В иммерсионном световом микроскопе обнаруживаются самые крупные элементарные тельца. Так, при натуральной оспе в жидкости кожных пузырьков находят вирионы Пашена, а в таких же везикулах при ветряной оспе – вирионы Арагана.

Легче при вирусных инфекциях выявить внутриклеточные включения (рисунок 8).

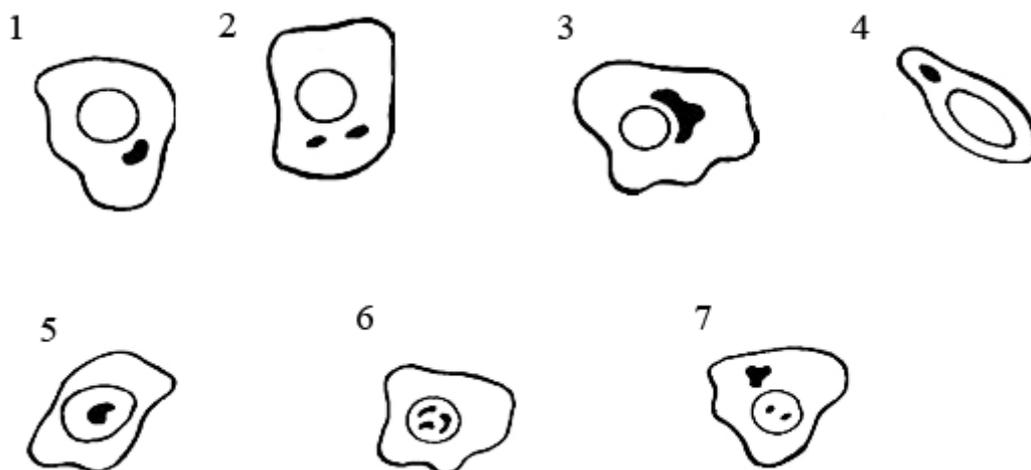


Рисунок 8 – Вирусные включения:

1 – тельца Гуарниери в клетке, зараженной вирусом оспы; 2 – включения в цилиндрическом эпителии, зараженном вирусом гриппа; 3 – включения в эпителии, зараженном реовирусом; 4 – тельца Бабеша-Негри в нейрочитах; 5,6 – внутриядерные включения в эпителии, зараженном герпес- и аденовирусом; 7 – внутриядерные и цитоплазматические включения в эпителии, зараженном вирусом кори

В основном они представлены скоплениями вирионов вперемешку с реактивными клеточными продуктами и в зависимости от места репликации вирионов находятся в цитоплазме или ядре клеток-хозяев. В частности, цитоплазматическими включениями являются тельца Гуарниери в эпителиальных клетках, скопления реовирусов и вирусов гриппа в них, тельца Бабеша-Негри – в нейрочитах. Ядерные адено-, папова- и герпесвирусные включения состоят из клеточного материала. Изредка в одной и той же клетке вирусы, например, коревой, формируют цитоплазматические и ядерные включения.

По форме, размерам, структуре, отношению к красителям вирусные включения строго специфичны. Например, тельца Гуарниери имеют округлую, серповидную или амебоидную форму диаметром 1–10 мкм, тельца Бабеша-Негри – овальные или эллипсоидные, достигающие 20 мкм, включения реовирусов серповидные, наполовину охватывающие клеточное ядро, коревые включения – в виде почкующихся мелких дрожжей (рисунок 9).

В препаратах, обработанных мечеными антителами под люминесцентным микроскопом обнаруживают вне- и внутриклеточно расположенные

вирионы в виде разноцветных точек и конгломератов в зависимости от природы используемого флюорохрома (рисунок 10).



Рисунок 9 – Тельца Бабеша-Негри в нервных клетках головного мозга

На сегодняшний день в ветеринарии применяется единственный информативный и достаточно точный метод диагностики бешенства у животных. Это посмертное исследование срезов аммоновых рогов головного мозга и обнаружение в них специфических включений – телец Бабеша-Негри. Состоят тельца Бабеша-Негри из тонковолокнистого матрикса и вирусного рибонуклеопротеида.

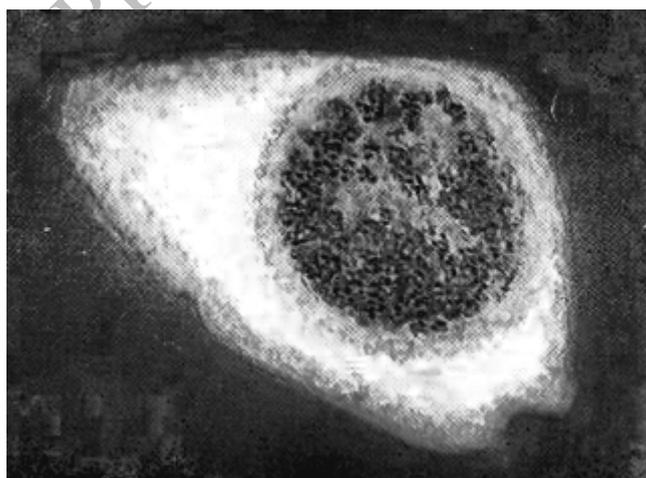


Рисунок 10 — Вирус гриппа в культуре клеток через 12 ч после инфицирования (иммунофлюоресцентная микроскопия,  $\times 1200$ ). Видны светящиеся комплексы в ядре и на внутренней поверхности плазмалеммы

2 Используя флюоресцентный микроскоп, рассмотрите препарат культуры клеток инфицированных вирусом и обработанных флюорохромом. Сделайте рисунок препарата и укажите светящиеся точки-вирусы.

3 Используя световой микроскоп, рассмотрите фиксированный препарат нейтроцитов с включениями рабовирусов (тельца Бабеша-Негри). Сделайте рисунок препарата и укажите тельца Бабеша-Негри.

**Задание 2:** изучите особенности электронной микроскопии и ее возможности при изучении морфологии и ультраструктуры вирусов.

Ход работы

1 Ознакомьтесь с приведенной ниже общей характеристикой метода электронной микроскопии.

*Электронная микроскопия.* Теоретически разрешение просвечивающего электронного микроскопа составляет 0,002 нм; реальное разрешение современных микроскопов приближается к 0,1 нм. На практике разрешение для биологических объектов достигает 2 нм.

В электронном микроскопе вирусы идентифицируют по тонким деталям их ультраструктуры. С этой целью получают микрофотографии. При этом содержащий вирусы материал суспендируют в хорошо испаряющейся среде и наносят на сетку с подложкой, представляющей собой пленку из коллодия или из чистого углерода, слабо поглощающую электроны. Улучшение электронно-микроскопического изображения вирусов достигается увеличением их электронной плотности путем воздействия на них паров четырехоксида осмия. Широко используются также методы напыления на вирусодержащие материалы тяжелых металлов (золото, палладий, уран), хорошо оттеняющих форму и объем вирусных частиц, и негативного контрастирования вирионов нейтральными растворами фосфовольфрамата или уранилацетата, глубоко проникающими в их «извилины и зазоры». Наконец, конфигурация вирионов отчетливо отпечатывается на матрицах-репликах высохших пленок пластмассы, раствором которых они заливаются. Симметрию и распределение белковых субъединиц в блоке-ансамбле вирусных кристаллов изучают с помощью рентгеноструктурного анализа.

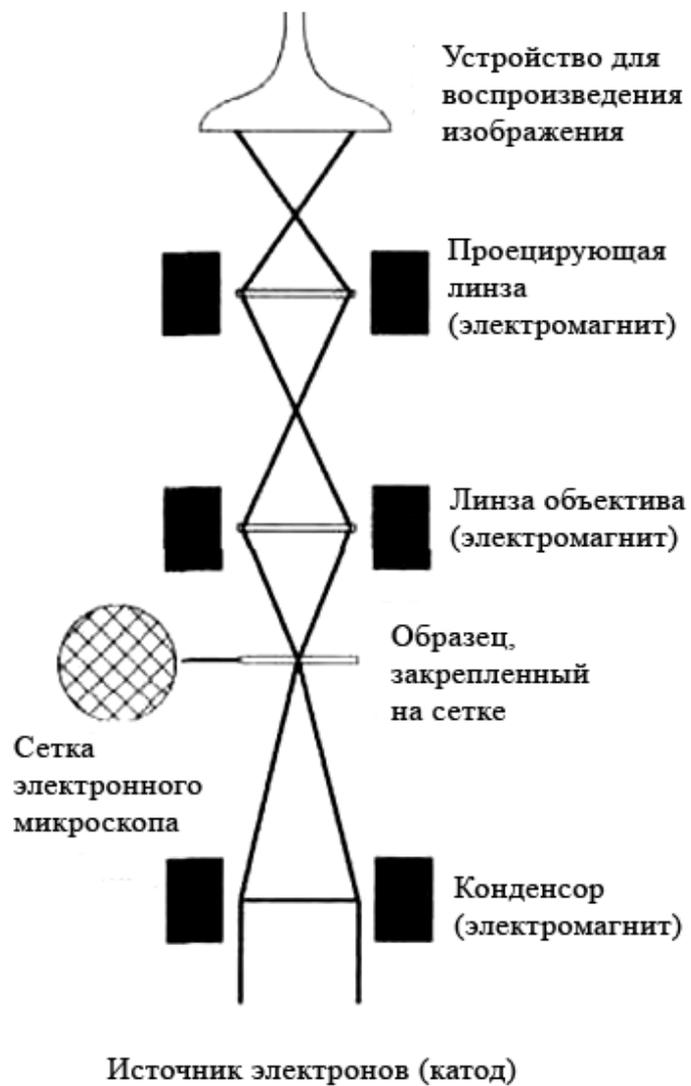
Просвечивающий электронный микроскоп (рисунок 11) состоит из колонны, через которую в вакууме проходят электроны, излучаемые катодной нитью. Пучок электронов, фокусируемый кольцевыми магнитами, проходит через подготовленный образец. Характер рассеивания электронов зависит от плотности образца. Проходящие через образец электроны наблюдают на флюоресцирующем экране и регистрируют при помощи фотопластинок.

Сканирующий (растровый) электронный микроскоп РЭМ применяют для получения трёхмерного изображения поверхности исследуемого объекта. В РЭМ применяются электронные линзы для фокусировки электронного пучка в пятно очень малых размеров. Это пятно непрерывно обегает некоторый участок образца аналогично лучу, обегаящему экран

телевизионной трубки. Электрический сигнал, возникающий при бомбардировке объекта электронами пучка, используется для формирования изображения на экране телевизионного кинескопа или электронно-лучевой трубки. Увеличение (отношение размера изображения на экране к размеру области, обеганной пучком на образце) составляет от 10 до 10 млн.



А



Б

Рисунок 11 – Внешний вид и схема электронного микроскопа

2 Рассмотрите электронные микрофотографии вирусов (рисунки 12-15, демонстрационный материал).



Рисунок 12 – Аденовирусы

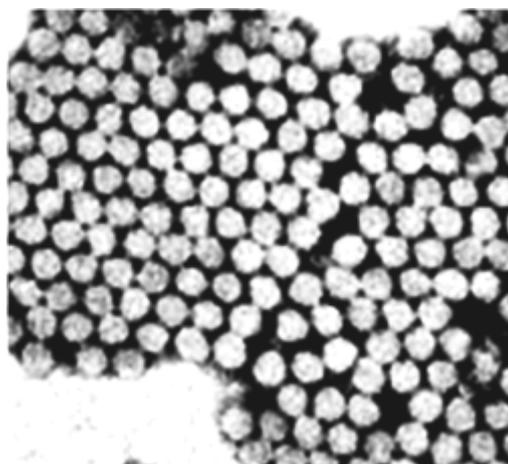


Рисунок 13. – Вирусы гепатита А

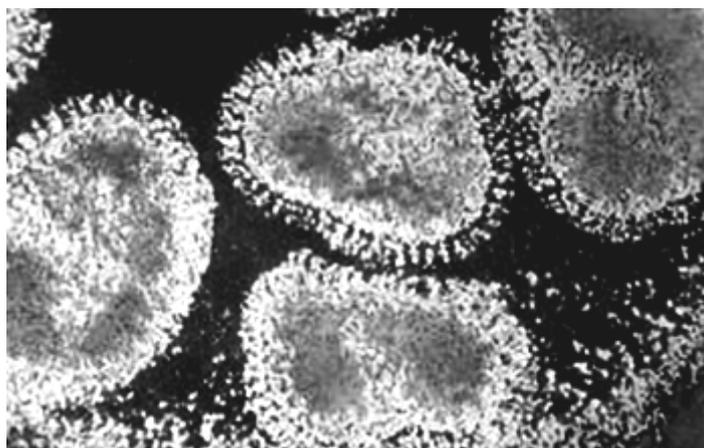


Рисунок 14 – Вирусы гриппа

3 В протоколе занятия кратко опишите технологию электронной микроскопии.

**Задание 3:** изучите структуру вируса натуральной оспы.

Ход работы

1 Рассмотрите электронную микрофотографию вириона оспы (рисунок 16).

2 Изучите схему строения вируса натуральной оспы (рисунок 17) и найдите соответствия структурных элементов на схеме и фотографии.

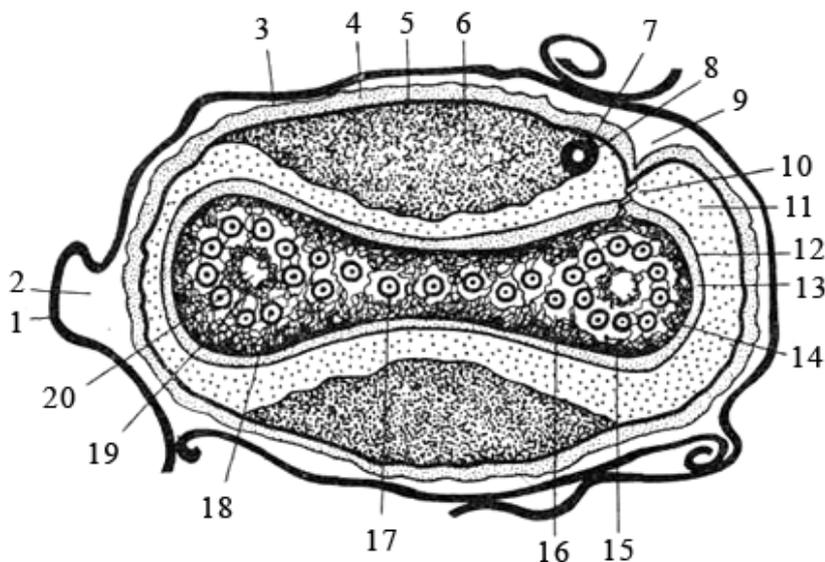
3 Укажите на соответствующем рисунке протокола занятия сердцевину, капсид, суперкапсид вириона оспы и захваченные им фрагменты цитоплазматической мембраны.



Рисунок 15 – Электронная микрофотография фага эшерихии коли



Рисунок 16 – Вирион натуральной оспы ( электронная микроскопия,  $\times 230\,000$  )



**Рисунок 17 – Схема строения вириона оспы:**

1 – фрагмент цитоплазматической оболочки, захваченной вирионом при выходе из клетки; 2 – пространство между этой оболочкой и поверхностью вириона; 3 – внешняя осмиофильная мембрана оболочки вириона; 4 – средняя осмиофильная мембрана оболочки вириона; 5 – внутренняя мембрана оболочки вириона; 6 – боковое (латеральное) тело; 7 – фрагмент клеточной оболочки; 8 – внутривирусная гранула; 9 – локальное втяжение оболочки; 10 – тяж, связывающий компонент нуклеоида с оболочкой; 11 – вирусоплазма; 12 – внешняя осмиофильная мембрана оболочки нуклеоида; 13 – средняя осмиофобная мембрана оболочки нуклеоида; 14 – внутренняя осмиофильная мембрана оболочки нуклеоида; 15 – нуклеоидоплазма; 16 – осмиофобный компонент S-образной структуры; 17 – кольцо – срез спиральной укладки ДНК (гипотеза); 18 – центр этого кольца; 19 – внутренний компонент S-образной структуры нуклеоида; 20 – центральный компонент S-образной структуры нуклеоида.

## **Тема 2 Принципы классификации вирусов животных, человека и растений**

### 2.1 Основные семейства

#### 2.2 Фитовирусы

#### 2.3 Методы выделения, культивирования и идентификации вирусов

### 2.1 Основные семейства

Вирусы отнесены к царству *Vira*. По типу нуклеиновой кислоты выделяют *рибовирусы* (РНК-вирусы) и *дезоксирибовирусы* (ДНК-вирусы). Для вирусов предложены следующие таксономические категории (по восходящей): Вид (*Species*) → Род (*Genus*) → Подсемейство (*Subfamilia*) →

Семейство (*Familia*). Категории подсемейств и родов разработаны не для всех вирусов.

Название всех вирусных родов оканчивается словом «*virus*», для названия семейств используется суффикс «*-idae*», а подсемейств – «*-inae*».

Из более чем 55 семейств вирусов, признанных Международным комитетом по таксономии вирусов, следующие 19 включают вирусы человека и животных: поксвирусы, иридовирусы, вирусы герпеса, аденовирусы, паппавирусы, вирусы гепатита В, парвовирусы, реовирусы, тогавирусы, коронавирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы, филовирусы, ортомиксовирусы, буньявирусы, аренавирусы, ретровирусы, пикорнавирусы, калицивирусы.

К числу семейств вирусов исключительно позвоночных относятся *Herpesviridae*, *Adenoviridae*, *Papovaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae*, *Coronaviridae*.

Размножаться в двух типах хозяев – позвоночных и беспозвоночных (клещи, комары, москиты) способны вирусы семейства *Bunyaviridae*, роды *Alphavirus* и *Flavivirus* семейства *Togaviridae*, вирусы родов *Vesiculovirus* и *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*, род *Orbivirus* семейства *Reoviridae*, вирус африканской лихорадки свиней семейства *Iridoviridae*. Такие вирусы составляют экологическую группу арбовирусов, т. е. вирусов позвоночных, передающихся членистоногими.

**Поксвирусы.** Семейство *Poxviridae* включает вирусы, патогенные для насекомых, птиц и млекопитающих. Вирионы кирпичеобразной формы (рисунок 18 А), их размеры составляют 250–390 × 200–260 нм.



А



Б

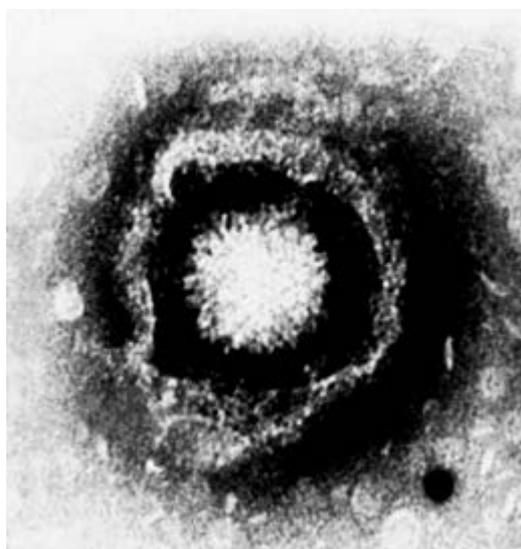
Рисунок 18 – Поксвирусы:

А – кирпичеобразная форма вириона; Б – вирус контагиозного моллюска

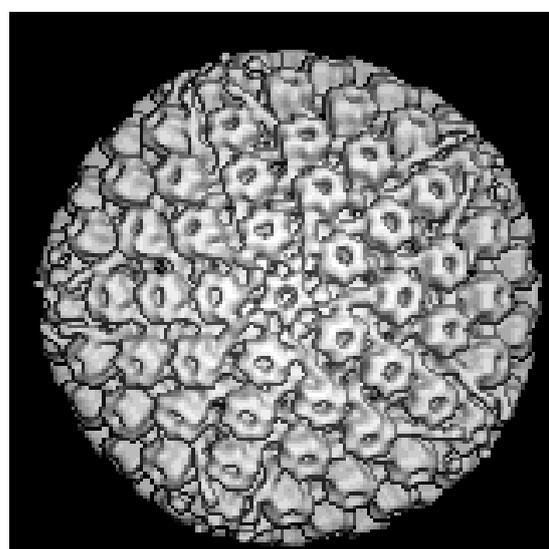
Вирион включает сердцевину, окруженную гладкой мембраной и слоем равномерно расположенных цилиндрических структур. Снаружи располагаются овалы (белковые тела), окруженные оболочкой с характерной бороздчатой структурой. Геном – двухнитевая молекула ДНК.

Семейство включает вирусы осповакцины и натуральной оспы (род *Orthopoxvirus*), вирусы узелков доярок – псевдооспы крупного рогатого скота (род *Parapoxvirus*), вирус контагиозного моллюска (род *Molluscipoxvirus*) (рисунок 18 Б), вирусы оспы Тана и Яба – оспы обезьян (род *Yatapoxvirus*).

**Вирусы герпеса.** Герпесвирусы *Herpesviridae* [от греч. *herpes*, ползучее поражение кожи] – группа сравнительно крупных вирусов диаметром 150–200 нм (рисунок 19 А, Б) и кубическим типом симметрии. Геном представлен двухнитевой молекулой ДНК, содержащей короткий (18 %) и длинный (82 %) компоненты.



А



Б

**Рисунок 19 – Герпесвирусы:**

А – нуклеокапсид вирусной частицы и отходящая на различное от него расстояние оболочка формируют характерную картину «жарящегося яйца»; Б – модель вирусной частицы

Суперкапсиды герпесвирусов образованы фрагментами ядерных мембран (созревание дочерних популяций происходит на внутренней мембране ядер зараженной клетки – рисунок 20) и пронизан гликопротеиновыми шипами. Между нуклеокапсидом и суперкапсидом расположен покровный слой – тегумент.

**Аденовирусы.** Патогенные для человека вирусы включены в состав рода *Mastadenovirus* (аденовирусы млекопитающих) семейства *Adenoviridae*. Аденовирусы организованы по принципу кубической симметрии и не имеют суперкапсиды. Геном представлен линейной молекулой двухнитевой

ДНК. Средний диаметр вириона равен 60–90 нм. Капсид состоит из 252 капсомеров, 240 из них (гексоны) образуют его грани, 12 (пентоны) – полигональные основания и прикрепленные к нему нити (рисунок 21).

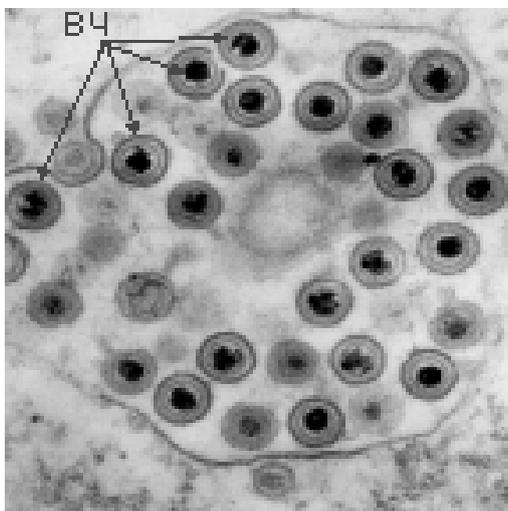


Рисунок 20 – Вирусные частицы (ВЧ) простого герпеса, покидающие ядро инфицированной клетки. Электронная микроскопия,  $\times 40\,000$

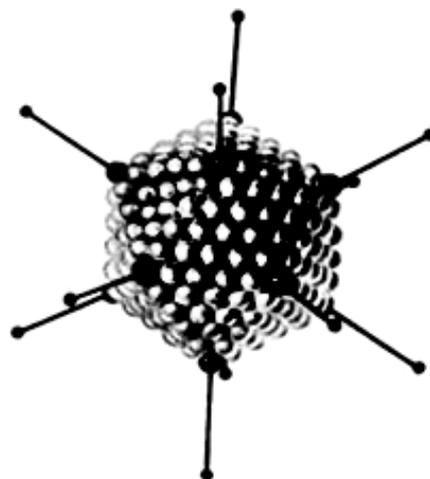
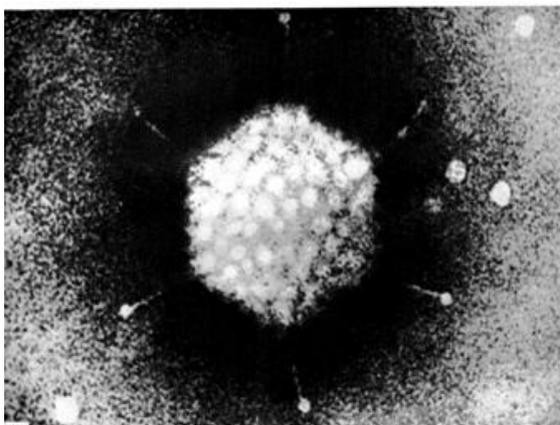
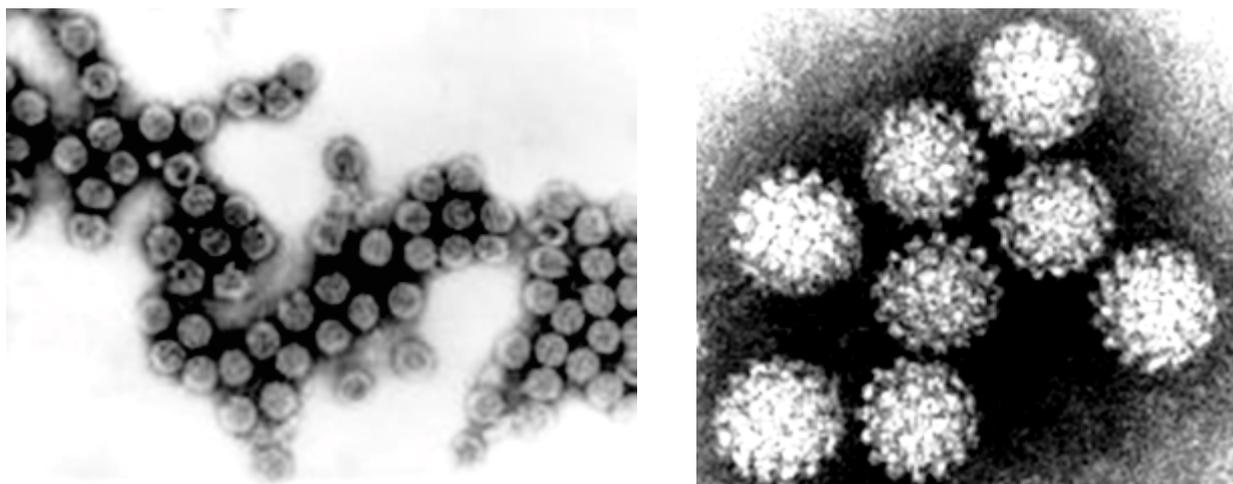


Рисунок 21 – Вид аденовируса при электронной микроскопии (А) ( $\times 600\,000$  раз) и его модель (Б)

**Паповавирусы.** Название вирусов указывает на способность вызывать опухолевые трансформации клеток [па(пиллома) + по(лиома) + ва(куолизирующие) вирусы]. Семейство *Papovaviridae* включает роды *Papillomavirus* и *Polyomavirus* (рисунок 22 А, Б), последние приводят к развитию папиллом и полиом у своих хозяев – различных млекопитающих (в том числе и человека). Геном образует кольцевая ДНК; капсид организован по типу кубической симметрии. Средний размер вирионов 45–50 нм.



А

Б

Рисунок 22 – Папилломавирус (А) и полиомавирус (Б) (электронная микроскопия)

**Вирусы гепатита В.** Вирус гепатита В включён в состав рода *Orthohepadnavirus* семейства *Hepadnaviridae*. Вирионы вируса гепатита В сферической формы 42 нм в диаметре имеют суперкапсид. Геном образует неполная (одна нить короче, рисунок 23) двухнитевая кольцевая молекула ДНК. В состав сердцевины также входит ДНК-зависимая ДНК-полимераза. В динамике процесса репродукции вирусная ДНК интегрирует в ДНК клетки. В крови больных гепатитом В циркулируют частицы трёх морфологических типов. Наиболее часто обнаруживают сферические частицы около 22 нм в диаметре; реже – нитевидной формы около 22 нм в диаметре и 50–230 нм в длину. *Вирусные частицы этих типов не проявляют инфекционных свойств.* Лишь 7 % частиц представлены комплексными двухслойными сферическими образованиями с полной структурой – *частицы Дейна* (рисунок 24), проявляющие выраженную инфекционность. Их оболочку на 70 % поверхности образуют белки.

**Парвовирусы.** *Parvoviridae* – семейство мелких вирусов, содержащих однонитевую ДНК. Репликация и сборка вирионов происходит в клеточном ядре. Выделяют 3 рода: *Parvovirus* (типичный вид – вирус крыс Килхэма), *Densovirus* и род, включающий ассоциирующиеся с тканями миндалин сателлитные вирусы.

**Реовирусы.** Семейство *Reoviridae* объединяет 9 родов, включающих виды, патогенные для человека, позвоночных, насекомых и растений. Вирионы сферической формы (диаметр 60–80 нм), обладающие двумя капсидными оболочками, суперкапсид отсутствует. На поверхности наружного капсида находится гемагглютинин. Геном образован сегментированной

двухнитевой молекулой -РНК. Нуклеокапсид образован по типу кубической симметрии. Капсид кольцевой формы включает многочисленные белковые шипы, придающие вирусам «пушистый» вид.

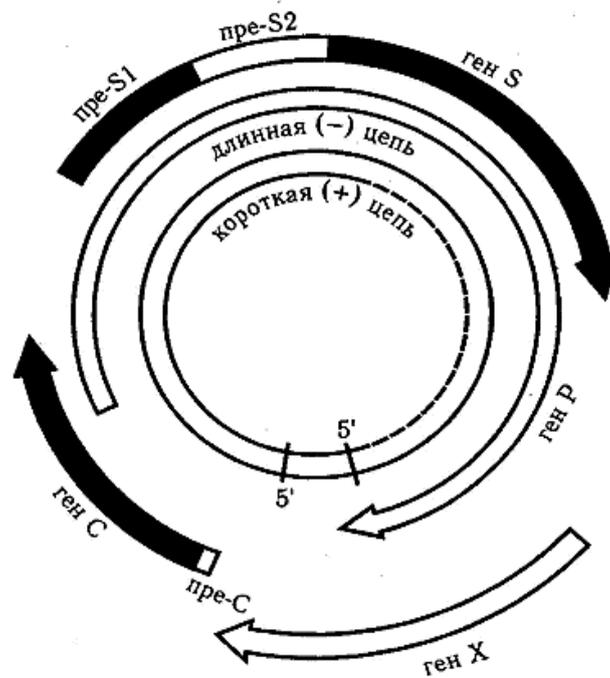


Рисунок 23 – Схема строения генома вируса гепатита В

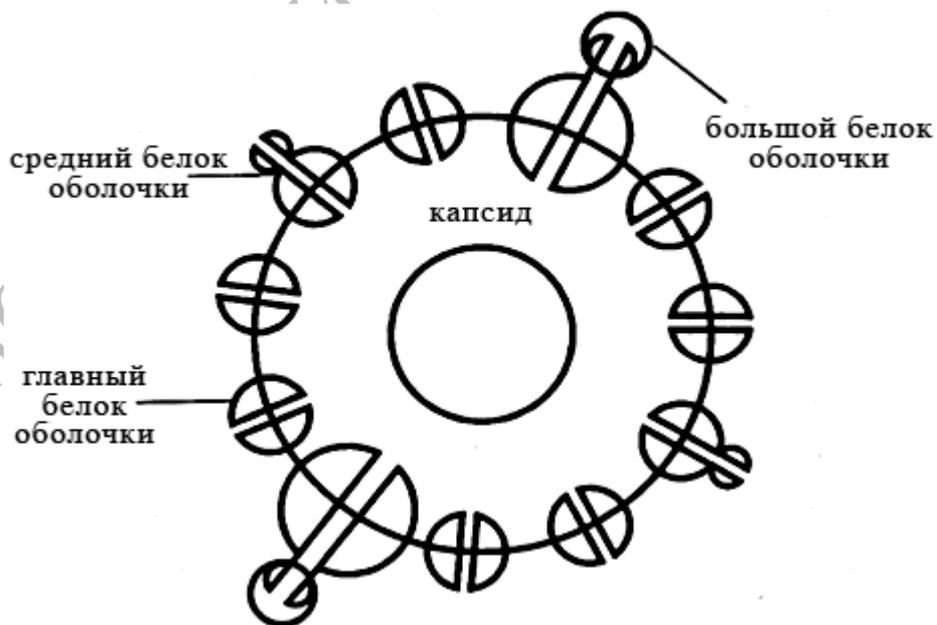


Рисунок 24 – Схема строения частицы Дейна

**Тогавирусы.** Краснуха – острая инфекция, проявляющаяся кратковременной лихорадкой, мелкопятнистым покраснением кожи, увеличением лимфатических узлов и поражением плода у беременных. Вирус краснухи включён в род *Rubivirus* семейства *Togaviridae* и является единственным тогавирусом, эпидемиология которого не связана с членистоногими-переносчиками. Зрелые вирионы имеют сферическую форму и диаметр 50–60 нм. Геном образован несегментированной молекулой +РНК. Липидная оболочка суперкапсида содержит гликопротеины, имеющие форму шипов.

**Коронавирусы.** Семейство *Coronaviridae* включает один род – *Coronavirus*, объединяющий вирионы округлой или овальной формы диаметром 50–220 нм. Зрелые частицы окружены суперкапсидом, включающим редко расположенные гликопротеиновые шипы, состоящие из тонкой шейки и массивной шаровидной овальной или грушевидной головки, что придаёт им сходство с солнечной короной (рисунок 25).

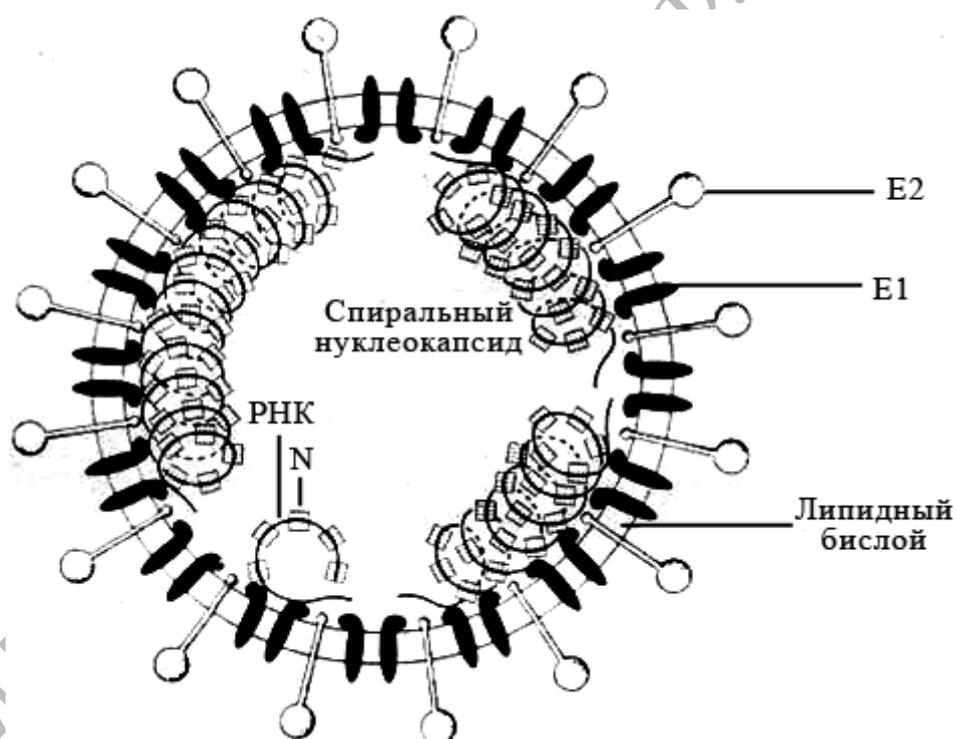


Рисунок 25 – Модель коронавируса

Вирусный нуклеокапсид представляет собой протяженную, несегментированную, гибкую спираль, содержащую геномную +РНК и большое число молекул фосфорилированного нуклеокапсидного белка N. Вирусная оболочка состоит из липидного бислоя, образующегося из внутриклеточной мембраны клетки-хозяина, и двух вирусных гликопротеинов E1 и E2. Матриксный гликопротеин E1 пронизывает липидный бислой и взаимодействует с нуклеокапсидом внутри вирусной частицы.

У человека коронавирусы вызывают поражения воздухоносных путей (рисунок 26) и желудочно-кишечного тракта.

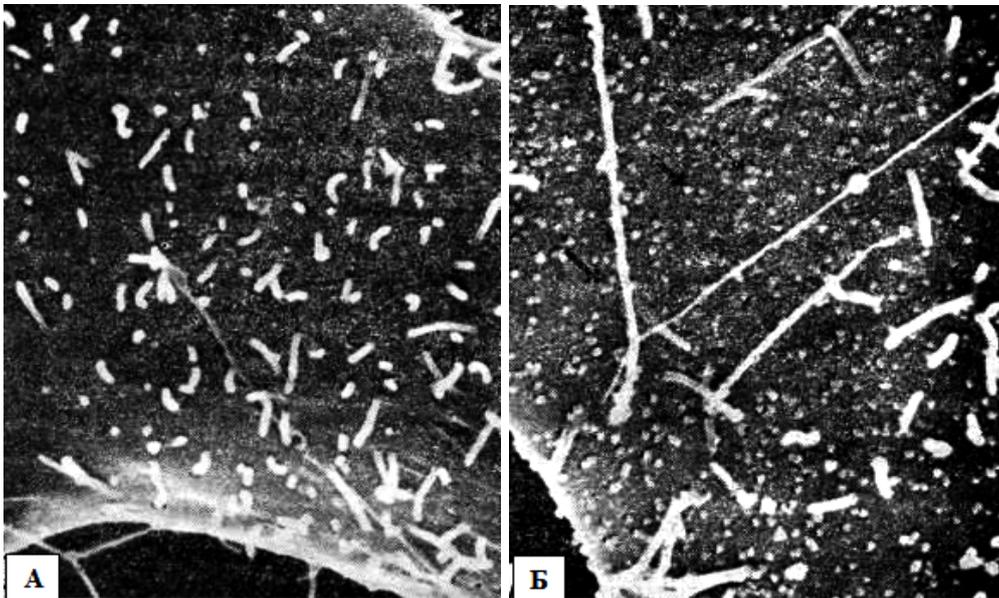


Рисунок 26 – Микрофотографии поверхностей незараженной клетки и клетки, зараженной коронавирусом. Контрольная клетка (А) имеет гладкую плазматическую мембрану, покрытую многочисленными цилиндрическими микроворсинками. В зараженной клетке (Б) с плазматической мембраной и микроворсинками связано большое число сферических вирионов коронавируса

**Парамиксовирусы.** Все четыре рода семейства *Paramyxoviridae* включают возбудителей инфекций у человека: род *Paramyxovirus* – вирусы парагриппа 1- и 3-го типов; род *Rubulavirus* – вирусы эпидемического паротита и парагриппа 2- и 4-го типов; род *Morbillivirus* – вирусы кори и подострого склерозирующего панэнцефалита. Род *Pneumovirus* – РС-вирус человека. Парамиксовирусы – сферические «одетые» вирусы; средний размер вириона – 100–800 нм. Геном образует линейная, несегментированная молекула -РНК. С ней связаны белок NP и полимеразные белки P и L, образующие нуклеокапсид со спиральной симметрией. Нуклеокапсид окружён матриксным М-белком. Суперкапсид образован двухслойной липидной мембраной, пронизываемой гликопротеиновыми «шипами» HN и F (ответственны за слияние с клеточной мембраной, образование симпластов и проявляющие гемолитическую и цитотоксическую активность). Репликация вирусов полностью реализуется в цитоплазме клеток хозяина.

**Рабдовирусы.** Рабдовирусы включают возбудителя бешенства (род *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*). Зрелые вирионы имеют пулевидную форму и размер 75×180 нм; один конец закруглён, другой плоский. Геном

образует однонитевая несегментированная молекула -РНК. Сердцевина вириона симметрично закручена внутри оболочки по продольной оси частицы. Нуклеокапсид дополняют молекулы сердцевинного белка (NP) и вирусной транскриптазы. Нуклеокапсид покрывает суперкапсид, включающий поверхностные гликопротеиновые «шипы». Репродукция вируса реализуется в цитоплазме клетки.

**Филовирусы.** Род *Filovirus* семейства *Filoviridae* объединяет палочковидные или нитевидные, ветвящиеся вирусы (лат. *filum*, нить). Средние размеры вирионов 14×80 нм. Геном образован молекулой РНК. Нуклеокапсид организован по типу спиральной симметрии и образует тяж, покрытый суперкапсидом с гликопротеиновыми шипами длиной 7–10 нм. Для человека патогенны вирусы геморрагических лихорадок Марбург и Эбола. Заболевание регистрируется в экваториальных и субэкваториальных районах Африки.

**Ортомиксовирусы.** В состав семейства *Orthomyxoviridae* включены вирусы гриппа человека (род *Influenzavirus A*, *B* и род *Influenzavirus C*). Вирусы гриппа — овальные «одетые» вирусы; вирионы часто имеют неправильную форму; их средний размер составляет 80–120 нм. Геном образован однонитевой молекулой -РНК, состоящей из 8 отдельных сегментов. Нуклеокапсид организован по типу спиральной симметрии. Суперкапсид образован липидным бислоем, который пронизывают гликопротеиновые шипы (*стикулы*) (рисунок 27).

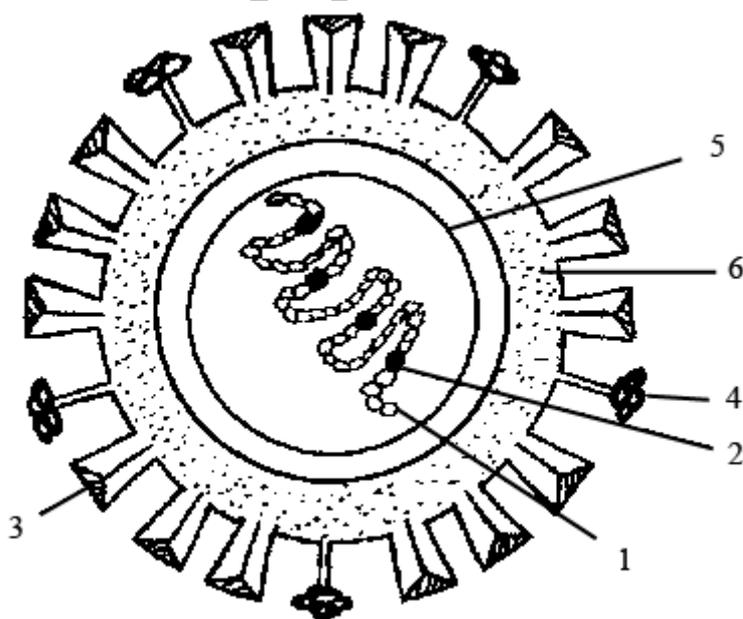


Рисунок 27 – Схема строения вируса гриппа:

1 – спираль рNP; 2 – белки рV1, рV2, рА; 3 – гемагглютинин (500–600 шипов); 4 – нейраминидаза (100–160 шипов); 5 – матриксный белок; 6 – липидный бислой

Репликация ортомиксовирусов первично реализуется в цитоплазме инфицированной клетки; синтез вирусной РНК происходит в ядре.

Наибольшую эпидемическую опасность представляют вирусы гриппа А, вирус гриппа В вызывает локальные вспышки и эпидемии, вирус гриппа С – спорадические случаи гриппа.

**Буньявирусы.** Семейство *Bunyaviridae* считается крупнейшим по количеству входящих в него вирусов (около 250). Вирионы буньявирусов имеют сферическую форму и диаметр 90–100 нм. Геном образован молекулой -РНК, состоящей из трех сегментов. Нуклеокапсид организован по типу спиральной симметрии. Снаружи нуклеокапсид покрыт двухслойным липидным суперкапсидом, на котором располагаются белковые структуры с гемагглютинирующей активностью, объединенные в форме поверхностной решетки.

В род *Bunyavirus* входят возбудители энцефалитов. Вирусы рода *Phlebovirus* вызывают различные москитные лихорадки. Род *Nairovirus* включает вирус Конго-крымской геморрагической лихорадки, вызывающей заболевания в России, Молдавии, Украине, на Балканах и в Африке.

**Аренавирусы.** Характерный морфологический признак представителей семейства *Arenaviridae* – наличие внутри вирусных частиц электронноплотных зернистых структур, напоминающих песчаные вкрапления (лат. *arena*, песок). Семейство включает один род *Arenavirus*, представленный округлыми вирионами диаметром 110–130 нм. Геном образует одонитевая молекула -РНК, содержащая пять сегментов. Вирионы содержат транскриптазу, ответственную за синтез комплементарной нити +РНК, исполняющей роль матрицы. Нуклеокапсид окружен суперкапсидом, на котором расположены многочисленные гликопротеиновые булавовидные шипы. Все аренавирусы относятся к экологической группе ретровирусов, и все виды патогенны для человека. Наиболее типичны тяжелые геморрагические лихорадки с высокой летальностью, гриппоподобные поражения, реже серозные менингиты.

**Ретровирусы.** В состав подсемейства *Lentivirinae* семейства *Retroviridae* входит вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). Характерные особенности ретровирусов – уникальное строение генома и наличие обратной транскриптазы (РНК-зависимая ДНК-полимераза). Обратная транскриптаза (или ревертаза) обеспечивает обратную направленность потока генетической информации – не от ДНК к РНК, а наоборот, от РНК к ДНК, в связи с чем семейство и получило своё название (англ., *retro*, обратно).

Зрелые вирионы ВИЧ имеют сферическую форму, их размеры не превышают 100–120 нм в диаметре. Геном образуют две нити +РНК; их связывают белки р6 и р7 (цифра соответствует молекулярному весу в кД). Капсид образует белок р24. Сердцевина вириона имеет цилиндрическую или конусовидную формы; её формируют белки р18 и р24. В сердцевине располагаются РНК, внутренние белки (р7 и р9), обратная транскриптаза и

эндонуклеаза. Матричный белок p17 формирует прослойку между сердцевинной вириона и внешней оболочкой. Суперкапсид образован двойным липидным слоем, который пронизывают гликопротеиновые шипы. Каждый шип состоит из белков gp41 и gp120 (рисунок 28).

Гликопротеины gp120 локализованы в выступающей части шипа и взаимодействуют с молекулами CD4 на мембранах клеток. Гликопротеины gp41 (белки слияния) располагаются внутри оболочки и обеспечивают её слияние с клеточной мембраной.

**Пикорнавирусы.** Семейство Picornaviridae [англ. *pico*, маленький и RNA – РНК] включает 4 рода: Enterovirus, Rhinovirus, Cardiovirus, Aphthovirus. Все представители этого семейства относятся к +РНК-содержащим вирусам. Молекула РНК нефрагментированная, заключена в икосаэдрический капсид, построенный из 60 субъединиц и содержащий 4 уникальных полипептида. Характерной чертой является трансляция вирионной РНК в зараженной клетке с образованием единой полипептидной нити, «нарезаемой» в дальнейшем протеазами с образованием вирусоспецифических белков. Размножаются пикорнавирусы в эпителии желудочно-кишечного тракта и могут поражать эпителиальные клетки дыхательных путей.

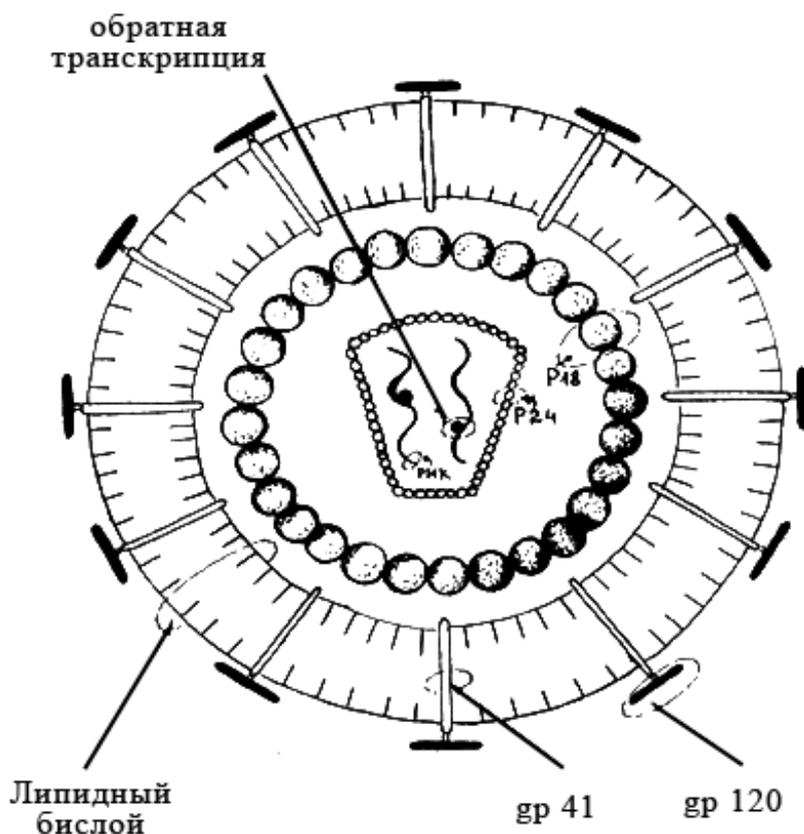


Рисунок 28 – Схема строения вируса иммунодефицита человека

**Калицивирусы.** Род *Calicivirus* семейства *Caliciviridae* объединяет вирусы с «голым» кубическим капсидом диаметром 37–40 нм. Геном образован молекулой +РНК. При негативно-контрастной микроскопии на поверхности вирионов обнаруживают 32 чашечковидных вдавления, в связи с чем вирусы и получили свое название (греч. *kalux*, чаша). Патогенные для человека виды вызывают гастроэнтериты и гепатиты.

**Иридовирусы.** Иридовирусы относятся к одноимённому семейству *Iridoviridae* и роду *Iridovirus*. В последний включены вирусы радужности насекомых. К семейству *Iridoviridae*, но к другому предполагаемому роду принадлежит ДНК-содержащий вирус африканской чумы свиней.

Вирусом африканской чумы свиней в природе инфицируются только свиньи (домашние и дикие виды) и мягкие клещи рода *Ornithodoros* (*O. moubata* – на юге Сахары в Африке, *O. erraticus* – в Португалии и Испании). Вирус передается среди клещей трансстадийно, трансвариально и половым путем. Свиньи инфицируются при укусах инфицированными клещами. Болезнь проявляется у домашних и диких европейских свиней.

Иридовирусы пойкилотерных животных выделены только от животных, имеющих водную стадию в цикле своего развития. Большинство иридовирусов насекомых передают синий или бирюзовый цвет инфицированным личинкам.

Вирион икосаэдральной симметрии. Вирусы животных имеют оболочку. Все иридовирусы содержат внутренние липидные мембрано-подобные структуры. Некоторые иридовирусы имеют многочисленные фибры, проходящие через икосаэдрон. Диаметр вирионов 130–170 нм. Это ДНК-геномные вирусы. Молекула ДНК линейная, двуспиральная. Геном иридовирусов позвоночных сильно метилирован.

Собственно **вирусы беспозвоночных** представлены семейством *Baculoviridae*, подсемейством *Entomopoxvirinae* (семейство *Poxviridae*) и родами *Densovirus* (семейство *Parvoviridae*), *Iridovirus* (семейство *Iridoviridae*), вирусами насекомых семейства *Rhabdoviridae*, группой вирусов цитоплазматического полиэдроза (семейство *Reoviridae*) и группой энтеро-вирусов беспозвоночных семейства *Picornaviridae*.

## 2.2 Фитовирусы

Фитовирусы широко распространены в природе. В разных регионах Земли они поражают самые разнообразные виды растений: дикорастущие и возделываемые, одно- и многолетние, овощные и плодовые культуры, травянистые, кустарники и деревья. Больше всего фитопатогенных вирусов выделено из цветковых растений, из папоротников и голосеменных – в редких (единичных) случаях. Размножаясь, фитопатогенные вирусы вызывают закручивание (рисунок 29 А), цветовую пестролистность, мозаику (рисунок 29 Б), скручивание (рисунок 30), бугристость и другие деформации листьев;

локальный и диффузный их некроз; обезображивание плодов; задержку роста растений.



Рисунок 29 – Скручивание листьев хлопчатника (А) и мозаика пшеницы (Б)



Рисунок 30 – Скручивание листьев хлопчатника

Окончательная таксономия фитопатогенных вирусов далека от завершения, что во многом связано с трудностью их выращивания *in vitro* в протопластах клеток растений и однослойных культурах клеток насекомых-переносчиков, в которых не происходит полный цикл их развития.

Лучше всего изучены вирусы экономически важных культур. Среди них выделяют две группы фитопатогенных вирусов: обычные классифицированные вирусы и вириоды [греч.-*eides*, подобные], или вирусоподобные агенты. Подавляющее большинство классифицированных вирусов растений – РНК-вирусы семейств рабдо- и реовирусов. Исключение составляют изометрические вирусы (50 нм) мозаики цветной капусты и мозаики георгины, содержащие обычную двухцепочечную ДНК и дефектные сателлиты вируса некроза табака и кольцевой пятнистости табака с неполноценным геномом, репликация и созревание которых происходят только в присутствии родительского вируса-помощника.

Группа РНК-вирусов с полноценным геномом насчитывает около сотни видов. Большинство из них вирионы с одноцепочечной линейной цельной РНК. По морфологии их подразделяют на три подгруппы: а) бациллярные (около 10 видов), отличающиеся таким же поперечником, как и у рабдовируса желтой карликовости картофеля, имеющего размеры 380×75 нм; б) палочковидные (более 30 видов), поперечник которых не превышает 18 нм, а длина варьирует от 300 нм, как у вируса табачной мозаики (ВТМ) и близких ему вирусов зеленой крапчатости мозаики огурца, кольцевой пятнистой орхидеи, мозаики подорожника и гороха, до 1250 нм, как у вирусов желтой свеклы и пятнистого некроза гвоздики; в) изометрические (более 30 видов), в диаметре не превышающие 30 нм, типичными представителями которых являются вирусы мозаики костра, крапчатости коровьего гороха, мозаики огурца, некротической кольцевой пятнистости сливы, кольцевой пятнистости табака, желтухи ячменя, кустистой карликовости томата, желтой мозаики турнепса.

К вирусам с двухцепочечной сегментированной РНК относят вирус раневой опухоли, геном которого состоит из 11 фрагментов, сходные с ним вирусы карликовости кукурузы и риса, сахарного тростника островов Фиджи и измельченности початков кукурузы.

Классификация вирусов растений не поднялась пока выше создания родов. Кроме вирусов растений, вошедших в семейство *Reoviridae* (роды *Phytoreovirus* и *Fijivirus*), и рабдовирусов растений, насчитывается свыше 20 групп (родов) вирусов, поражающих высшие растения. Отличительной особенностью многих вирусов растений является разобщенный геном, фрагменты которого находятся в различных вирионах. Для репликации таких вирусов необходимо, чтобы в клетке присутствовали вирионы, несущие в сумме полный набор генома.

**Фитовирусы, содержащие геномные РНК:** *Carlavirus* – группа вируса латентной мозаики гвоздики, *Comovirus* – группа вируса мозаики коровьего

гороха, *Cucumovirus* – группа вируса огуречной мозаики, *Nepovirus* – группа вируса кольцевой пятнистости табака, *Potexvirus* – группа ХВК (вирус Х картофеля), *Tobamovirus* – группа вируса табачной мозаики, *Tobravirus* – группа вируса погремковости табака, *Tombusvirus* – группа вируса кустистой карликовости томатов, *Tymovirus* – группа вирусов желтой мозаики турнепса, *Closterovirus* – группа вируса желтухи свеклы, *Hordeivirus* – группа вируса штриховатой мозаики ячменя, *Luteovirus* – группа вируса желтой карликовости ячменя, *Parvirus* – группа изометрических лабильных вирусов концевых пятнистостей.

**Фитовирусы, содержащие ДНК:** *Caulimovirus* – группа вируса мозаики цветной капусты.

## 2.3 Методы выделения, культивирования и идентификации вирусов

Лабораторные исследования при проведении идентификации вирусов и диагностике вирусных инфекций включают следующие этапы: выделение, культивирование, индикация (выявление) и идентификация вирусов.

### 2.3.1 Культивирование вирусов

Вирусы не растут на искусственных питательных средах, а размножаются только внутриклеточно. Крупным достижением было предложение Р. Гудпасчура в 1932 г. использовать для культивирования вирусов куриные эмбрионы. Окончательное решение проблемы культивирования вирусов оказалось возможным лишь после того, как были разработаны основные способы культивирования клеток вне организма.

**Использование куриных эмбрионов.** Куриные эмбрионы – практически идеальные модели для культивирования некоторых вирусов (например, гриппа и кори). Замкнутая полость эмбриона препятствует проникновению микроорганизмов извне, а также развитию спонтанных вирусных инфекций. Эмбрионы применяют для первичного выделения вирусов из патологического материала; для пассирования и сохранения их, а также для получения необходимых количеств вируса. Некоторые возбудители (например, герпесвирусы) вызывают характерные изменения (по ним можно распознать заболевание).

Для заражения обычно используют куриные эмбрионы 7–12-дневного возраста. Перед заражением определяют жизнеспособность эмбриона путем овоскопирования (просматривают в проходящем свете). Живые эмбрионы при овоскопировании проявляют двигательную активность, хорошо виден сосудистый рисунок. Простым карандашом очерчивают границы воздушной камеры.

Куриные эмбрионы заражают вирусосодержащим материалом в асептических условиях стерильными инструментами, предварительно обработав скорлупу над воздушным пространством йодом и спиртом. Заражение проводят на хорион-аллантоисную оболочку, в амниотическую или

аллантаисную полость, либо в желточный мешок (рисунок 29). Выбор метода заражения зависит от биологических свойств вируса.

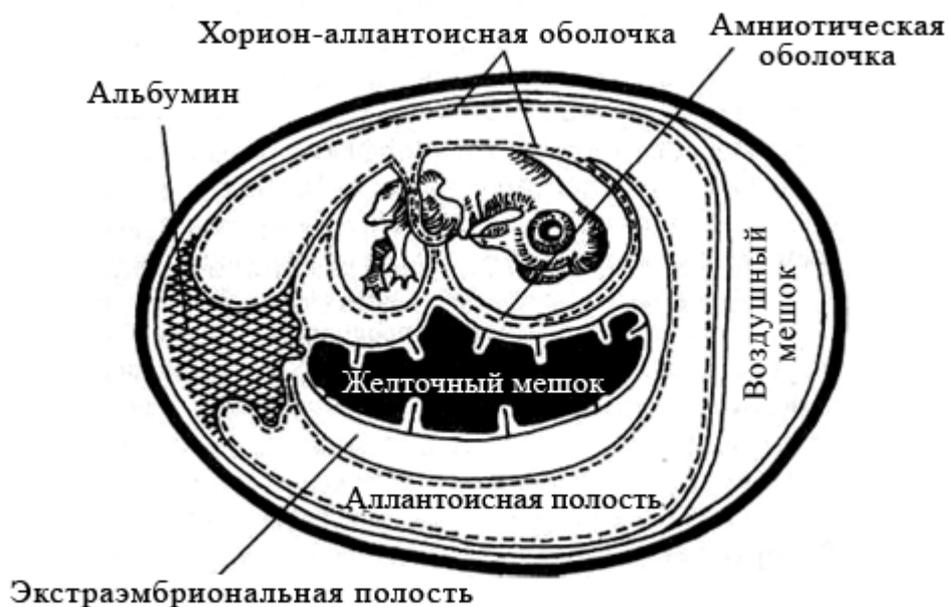


Рисунок 29 – Схематическое изображение развивающегося куриного эмбриона

**Культура клеток.** Вначале был использован *метод переживающих тканей*. Он заключался в том, что в колбу, содержащую питательную среду, вносили кусочек ткани. Клетки некоторых тканей в таких условиях могут переживать (но не размножаться) до 30 дней, а в них могут размножаться вирусы. Однако этот способ давал очень небольшой выход вирусов. Необходимо было разработать условия, при которых клетки ткани могли бы свободно размножаться.

Для получения культур клеток необходимо было решить четыре главных задачи:

- получить в необходимом количестве свободные (т. е. изолированные друг от друга) клетки;
- создать такие питательные среды и условия, в которых клетки могли бы активно размножаться;
- обеспечить условия, при которых в культурах клеток не могли бы размножаться бактерии;
- определить методы, с помощью которых можно было бы распознавать рост вируса в культуре клеток и идентифицировать его.

Для выделения изолированных (разобренных), но жизнеспособных клеток из разрушенных тканей, стали использовать обработку их слабым раствором трипсина, разрушающего межклеточные мостики. Для культивирования клеток были предложены различные среды, содержащие все

необходимые для размножения клеток питательные вещества (аминокислоты, основания, витамины и другие), минеральные соли, имеющие оптимальную рН и т. д. К питательным средам добавляли индикатор, по изменению цвета которого можно было судить о метаболизме клеток и их размножении. Было установлено, что в качестве основы, на которой клетки размножаются и образуют монослой, может быть использовано хорошо обработанное стекло пробирок и колб. Для подавления возможного роста бактерий вирусосодержащий материал перед посевом его в культуры клеток стали обрабатывать антибиотиками.

В 1949 г. Дж. Эндерс, Т. Веллер и Ф. Роббинс показали, что вирус полиомиелита хорошо размножается в *первично-трипсинизированных культурах* клеток, полученных из почек обезьян. Основным недостатком первично-трипсинизированных клеток заключается в том, что после нескольких пересевов они перестают размножаться. Поэтому предпочтением стали пользоваться культуры таких клеток, которые способны размножаться *in vitro* бесконечно долго. Такие *перевиваемые культуры* клеток (клеточные линии характеризуются бессмертием и гетероплоидным кариотипом) получают из опухолевых тканей (HeLa получена из карциномы шейки матки, HEp-2 – из карциномы гортани; Детройт-6 – из метастаза рака легкого в костный мозг; RH – из опухоли почки человека) или из мутантных клеток с полиплоидным набором хромосом. Однако опухолевые клетки нельзя применять для получения вакцин. Для этих целей используют только культуры таких клеток, которые не содержат никаких контаминантных вирусов и не обладают злокачественностью. Лучше всего этим требованиям отвечают культуры диплоидных клеток.

*Полуперевиваемые (диплоидные) культуры* клеток – клетки одного генотипа, способные *in vitro* выдерживать 50–100 пассажей, сохраняя при этом свой исходный диплоидный набор хромосом. Диплоидные линии фибробластов эмбриона человека используются как для диагностики вирусных инфекций, так и при производстве вирусных вакцин. Как оказалось, вирусы могут размножаться не только в культурах клеток, образующих монослой на стекле пробирок, но и в суспензиях живых клеток.

Для обеспечения жизнедеятельности культивируемых клеток необходимы питательные среды. По назначению они делятся на ростовые и поддерживающие. В *ростовых* питательных средах должно содержаться больше питательных веществ, обеспечивающих активное размножение клеток и формирование монослоя. *Поддерживающие* среды обеспечивают переживание клеток в уже сформированном монослое в период размножения в них вирусов.

### 2.3.2 Выделение вирусов

**Выделение вирусов в культурах клеток.** При выделении вирусов из различных инфекционных материалов (кровь, моча, слизистые отделяемые, смывы из органов) применяют культуры клеток, обладающих

наибольшей чувствительностью к предполагаемому вирусу. Для заражения используют культуры в пробирках с хорошо развитым монослоем клеток. Перед заражением клеток питательную среду удаляют и в каждую пробирку вносят по 0,1–0,2 мл взвеси исследуемого материала, предварительно обработанного антибиотиками для уничтожения бактерий и грибов. После 30–60 мин контакта вируса с монослоем клеток удаляют избыток материала, в культуру вносят поддерживающую среду и пробы оставляют в термостате до выявления признаков размножения вируса.

**Выделение вирусов на лабораторных животных.** При невозможности выделить и идентифицировать вирус стандартными методами *in vitro* инфекционный материал вводят чувствительным к возбудителю животным, и после развития типичного инфекционного процесса проводят повторное заражение чувствительных клеточных культур. Наиболее часто используют мышей, кроликов и обезьян; для выделения некоторых вирусов (например, вирусов Коксаки) заражают мышат-сосунков. Вследствие дороговизны и сложности содержания лабораторных животных, практически повсеместно их вытеснили клеточные культуры. Тем не менее животные модели активно используют для изучения особенностей патогенеза и формирования иммунных реакций при вирусных инфекциях.

Таким образом, для выделения чистых культур вирусов в лабораторных условиях в настоящее время используются следующие живые объекты (биологические модели): 1) культура клеток (тканей, органов); 2) куриные эмбрионы; 3) лабораторные животные.

### 2.3.3 Индикация вирусов

**Индикация вируса в курином эмбрионе.** Индикация вируса в курином эмбрионе производится по гибели эмбриона, положительной реакции гемагглютинации на стекле с аллантоисной или амниотической жидкостью, по образованию фокусных поражений («бляшек») на хорион-аллантоисной оболочке.

**Индикация вирусов в культурах клеток.** Индикатором наличия вируса в зараженных культурах клеток может служить:

1) развитие специфической дегенерации клеток – *цитопатическое действие вируса* (ЦПД), имеющее три основных типа: крупно- или мелкоклеточная дегенерация; образование многоядерных гигантских клеток (*симпластов*); развитие очагов клеточной пролиферации, состоящих из нескольких слоев клеток (*гроздевидная дегенерация клеток*).

Различают два механизма гибели клеток, вызываемой вирусами, – некроз и апоптоз. *Некроз* происходит из-за необратимых нарушений целостности клеточных мембран, *апоптоз* – вследствие фрагментации ядерной ДНК под действием клеточной эндонуклеазы.

Цитопатические эффекты оценивают при микроскопии клеточных культур. По степени поражения клеток выделяют вирусы с высокой или умеренной цитопатогенностью:

2) *обнаружение внутриклеточных включений*, располагающихся в цитоплазме и/или в ядрах пораженных клеток;

3) *положительная реакция гемагглютинации (РГА) или гемадсорбции (РГАдс)*. Некоторые вирусы, в частности, вирус гриппа, обладают особыми рецепторами (гемагглютинидами), с помощью которых они адсорбируются на эритроцитах и вызывают их склеивание (гемагглютинацию). Такие вирусы легко обнаруживаются с помощью реакции гемагглютинации или гемадсорбции (эритроциты адсорбируются на инфицированных вирусами клетках культуры тканей);

4) *феномен бляшкообразования*. Широкое распространение получил предложенный в 1952 г. Р. Дюльбекко *метод бляшек* (негативных колоний), позволяющий производить количественное определение вирусов. Для выделения вирусов монослой клеток после удаления питательной среды заражают вирусосодержащим материалом и покрывают слоем агара, содержащего индикатор нейтральный красный. Чашки (флаконы) инкубируют при 37 °С. Через 48–96 ч выявляются пятна – бляшки. Они имеют диаметр 1–3 мм и выглядят неокрашенными на розовом фоне. Пятна возникают за счет цитопатического действия вируса;

5) *цветная реакция Солка*. О росте вирусов в клетках можно судить с помощью индикатора, добавляемого к питательной среде. Если клетки активно осуществляют метаболизм, рН среды сдвигается в кислую сторону, и среда окрашивается в желтый цвет. В случае размножения вируса клетки погибают, рН среды мало меняется, и она сохраняет первоначальный (малиновый) цвет или (при нейтральной рН) приобретает оранжевый;

6) *реакция интерференции* (используется при отсутствии ЦПД, гемагглютинации и гемадсорбции): исследуемая культура повторно заражается вирусом, вызывающим ЦПД. В положительном случае ЦПД будет отсутствовать (реакция интерференции положительна). Если в исследуемом материале вируса не было, наблюдается ЦПД.

Кроме того, для обнаружения вируса в культурах клеток могут быть использованы различные серологические реакции.

***Индикация вирусов на лабораторных животных.*** Индикация вируса основана на обнаружении у животных признаков инфекционного заболевания, регистрации их гибели, изучении характера патоморфологических и патогистологических изменений в тканях и органах, выявлении положительной реакции гемагглютинации.

#### 2.3.4 Методы идентификации вирусов

Определение типа вируса (его идентификация) основано на нейтрализации биологической активности вируса с помощью типоспецифических сывороток. Конечный результат ее может быть установлен на основании следующих признаков:

1) *нейтрализация цитопатического действия*: в культуральную среду, содержащую изучаемый вирус, вносят коммерческую сыворотку (например,

к вирусу краснухи при подозрении на неё), инкубируют и заражают вторую культуру; через 1–2 дня в неё вносят известный цитопатогенный вирус. При наличии цитопатогенного эффекта делают вывод о том, что первая культура была заражена вирусом, соответствовавшим антителам примененной сыворотки;

2) *нейтрализация реакции гемадсорбции;*

3) *изменение проявления цветной пробы;*

4) *задержка (торможение) реакции гемагглютинации:* смешивают культуральную среду, содержащую возбудитель, с известной коммерческой антисывороткой и вносят в культуру клеток. После инкубации определяют способность культуры к гемагглютинации и при её отсутствии делают заключение о несоответствии вируса антисыворотке.

5) *нейтрализация в опытах на животных.*

Таким образом РН (реакция нейтрализации) основана на подавлении соответствующей реакции, феномена, развития инфекционного процесса после внесения в культуру или введения в организм животного смеси вируса со специфичными АТ, содержащимися в диагностической сыворотке.

#### **Вопросы для самоконтроля**

- 1 Назовите основные принципы классификации вирусов.
- 2 Приведите русские и латинские названия основных семейств вирусов человека и животных.
- 3 Назовите типовых представителей основных семейств вирусов и заболевания, вызываемые ими.
- 4 Каковы особенности морфологии и ультраструктуры вирусов человека и животных (основных семейств)?
- 5 Назовите РНК-геномные и ДНК-геномные фитовирусы.
- 6 Какие этапы включают в себя лабораторные исследования при идентификации вирусов и диагностике вирусных инфекций?
- 7 Какие биологические модели используются для выделения и культивирования вирусов человека и животных?
- 8 Как происходит заражение куриных эмбрионов в лабораторных условиях?
- 9 Какие методы получения культуры клеток вы знаете?
- 10 Как проводят идентификацию вирусов в курином эмбрионе и на лабораторных животных?
- 11 Какие существуют методы индикации вирусов на культуре клеток?
- 12 В чем заключается назначение и сущность реакций нейтрализации вирусов?
- 13 Назовите способы постановки реакций нейтрализации вирусов.

## Лабораторное занятие 2

### Основные семейства вирусов животных и растений

*Цель занятия:* изучить характеристики основных семейств вирусов на примерах их типовых представителей и приобрести навыки описания морфологии и структуры вирионов.

*Материалы:* 1) электронные микрофотографии и демонстрационные рисунки типовых представителей семейств вирусов: а) человека и животных, б) исключительно животных, в) насекомых, г) растений; 2) фотографии вирусной патологии: а) человека, б) позвоночных животных, в) насекомых, г) растений; 3) схемы строения вирионов основных семейств вирусов.

**Задание 1:** изучите морфологию и ультраструктуру типовых представителей основных семейств вирусов.

Ход работы

1 Рассмотрите электронные микрофотографии и демонстрационные рисунки, схемы строения типовых представителей основных семейств вирусов. Обратите внимание на форму, тип симметрии, поверхностные структуры вирионов.

2 Опираясь на основные критерии классификации вирусов и предложенную схему описания, составьте краткие характеристики основных семейств вирусов.

Схема описания вирусной частицы: 1) название семейства; 2) видовое название вируса; 3) чувствительные к данному вирусу организмы; 4) форма вириона; 5) размеры вириона; 6) тип симметрии нуклеокапсида; 7) наличие суперкапсида; 8) образования на поверхности вириона; 9) особенности генома вируса.

3 Запишите составленные характеристики в протокол занятия.

**Задание 2:** классифицируйте по типу генома основные семейства вирусов человека и животных, указывая типowego представителя.

Ход работы

1 Рассмотрите фотографии с патологиями, вызываемыми вирусами у человека и животных. Обратите внимание на внешние проявления заболевания.

2 В протоколе занятия составьте таблицы «Основные семейства +РНК-геномных вирусов», «Основные семейства -РНК-геномных вирусов» и «Основные семейства +ДНК-геномных вирусов» по следующей форме:

Семейство	Род	Типовой представитель

**Задание 3:** изучите основные характеристики фитовирусов и признаки вызываемых ими заболеваний у растений.

Ход работы

- 1 Рассмотрите фотографии растений, пораженных вирусами.
- 2 В протоколе занятия составьте таблицу «Основные семейства фито-вирусов»:

Семейство, род	Характеристика генома	Вызываемое заболевание и его признаки

### Лабораторное занятие 3

#### Методы выделения, культивирования и идентификации вирусов

*Цель занятия:* изучить принципы и методы выделения, культивирования и идентификации вирусов.

*Материалы и оборудование:* 1) световой микроскоп; 2) препараты для микроскопии (или фотографии препаратов) культур клеток неинфицированных вирусами и инфицированных вирусами: а) с крупноклеточной дегенерацией клеток, б) с мелкоклеточной дегенерацией клеток, в) с образованием симпластов, г) с развитием очагов клеточной пролиферации, д) с внутриклеточными включениями; 4) демонстрационная планшетка с положительной реакцией гемагглютинации; 5) фотография препарата или препарат для микроскопии с положительной реакцией гемадсорбции; б) демонстрационный препарат инфицированной вирусами культуры клеток с феноменом бляшкообразования; 7) штатив с пробирки, демонстрирующими цветную реакцию Солка; 8) демонстрационные варианты постановки реакции нейтрализации вирусов.

**Задание 1:** проведите индикацию вирусов в культурах клеток по цитопатическому действию.

Ход работы

1 Рассмотрите фотографии или промикроскопируйте в световой микроскоп при большом увеличении препараты неинфицированных и инфицированных вирусами культур клеток с разными типами цитопатического действия: а) с крупноклеточной дегенерацией клеток; б) с мелкоклеточной дегенерацией клеток; в) с образованием симпластов; г) с развитием очагов клеточной пролиферации.

2 Определите, какой тип цитопатического действия вы обнаружили на препаратах культур клеток инфицированных вирусами.

3 В протоколе занятия назовите и нарисуйте типы цитопатического действия вирусов.

**Задание 2:** проведите индикацию вирусов в культурах клеток по наличию внутриклеточных включений.

#### Ход работы

1 Рассмотрите фотографии или промикроскопируйте в световом микроскопе при большом увеличении препараты инфицированных вирусами культур клеток с внутриклеточными включениями. Обратите внимание на расположение включений в клетке (в цитоплазме или в ядре) и их размеры и форму.

2 В протоколе занятий сделайте рисунки рассмотренных препаратов и укажите внутриклеточные включения.

**Задание 3:** проведите индикацию вирусов в культурах клеток с использованием реакции гемагглютинации и гемадсорбции.

#### Ход работы

1 Изучите механизм реакции гемагглютинации и гемадсорбции. В протоколе занятия опишите сущность этих реакций.

2 Рассмотрите демонстрационный материал (планшетка с положительной реакцией агглютинации и препарат для микроскопии с реакцией гемадсорбции).

3 В протоколе занятия сделайте рисунки рассматриваемых реакций.

**Задание 4:** проведите индикацию вирусов в культурах клеток с использованием феномена бляшкообразования.

#### Ход работы

1 Изучите метод бляшек. В протоколе занятия опишите сущность феномена бляшкообразования.

2 Рассмотрите демонстрационный материал с феноменом бляшкообразования. Обратите внимание на цвет питательной среды и наличие в ней бляшек (негативных колоний).

3 В протоколе занятия сделайте рисунок культуры клеток с феноменом бляшкообразования.

**Задание 5:** проведите индикацию вирусов в культуре клеток с использованием цветной реакции Солка.

#### Ход работы

1 Изучите методику постановки цветной реакции Солка. В протоколе занятия кратко опишите сущность этой реакции.

2 Рассмотрите демонстрацию результатов цветной реакции Солка.

3 В протоколе занятия отразите результаты реакции на рисунке и сделайте вывод о наличии вируса в культуре клеток.

**Задание 6:** проведите идентификацию вируса с использованием реакции нейтрализации.

#### Ход работы

1 Изучите методику постановки реакций нейтрализации вирусов. В протоколе занятия кратко опишите сущность этой реакции.

2 Рассмотрите демонстрационный материал с постановкой одного из вариантов реакции нейтрализации.

3 В протоколе занятия укажите продемонстрированный вам вариант реакции нейтрализации и нарисуйте схему постановки этого варианта реакции.

### **Тема 3 Организация геномов вирусов и особенности их репликации**

3.1 РНК или ДНК как генетический материал вируса

3.2 Репродуктивные тип-варианты вирусов и взаимодействия между вирусами

3.3 Типы вирусных мутантов и взаимодействие между вирусами

3.4 Общие принципы выражения вирусного генома при репродукции вирусов

#### **3.1 РНК или ДНК как генетический материал вируса**

**Типы вирусных геномов.** Вирусная нуклеиновая кислота представлена только одной нуклеиновой кислотой (ДНК или РНК). Каждая из них является геномом. В разных по величине вирионах в геноме насчитывают от нескольких до многих десятков генов. Геномные нуклеиновые кислоты вирусов отличаются большим разнообразием структуры и формы.

Геном вируса является гаплоидным [греч. *Haploos*, одиночный и *eidos*, вид], т. е. представлен одним набором генов. Частично диплоидны [греч. *Diploos*, двойной] ДНК-содержащие вирусы, в ДНК которых встречаются повторяющиеся нуклеотидные последовательности. Полностью диплоидны ретровирусы, геном которых представлен двумя идентичными молекулами РНК.

**Особенности строения вирусной ДНК.** Вирусные ДНК по структуре могут быть: 1) цельными одноцепочечными; 2) двухцепочечными; 2) с «разрыв-дефектом» в одной цепи.

По форме молекула ДНК может быть: 1) линейной, 2) кольцевой (циркулярно-замкнутой), 3) ковалентно-сцепленные суперспирализованные (например, у паповавирусов).

В вирусной ДНК на концах молекулы имеются прямые или инвертированные (развернутые на 180°) повторяющиеся нуклеотидные последовательности. Их наличие обеспечивает способность молекулы ДНК замыкаться в кольцо.

Молекулярная масса вирусных ДНК в 10–100 раз меньше массы бактериальных ДНК.

**Особенности строения вирусной РНК.** Вирусные РНК различаются в еще большей степени. Молекулы РНК по структуре могут быть:

1) одно- и двухцепочечные (диплоидный геном); 2) цельные (сплошные) и фрагментированные (сегментированные) на 2–3 ... 8–12 сегментов.

Наличие сегментов ведет к увеличению кодирующей ёмкости генома.

По форме РНК различают: 1) линейные, 2) кольцевые.

Среди РНК-геномных вирусов с одноцепочечной линейной молекулой РНК различают вирусы с *+РНК (позитивным)* и *-РНК (негативным) геномом*.

*+РНК* выполняет и геномную и информационную функции, т. е. одновременно служит матрицей для синтеза вновь образующихся вирионных РНК и белков. Плюс-нити РНК имеют характерные окончания («шапочки») для распознавания рибосом.

*-РНК* не способны транслировать генетическую информацию непосредственно на рибосомах, то есть они не могут функционировать как иРНК. Синтез иРНК у РНК-негативных вирусов осуществляется в зараженной клетке на матрице *-РНК* с помощью вирусоспецифического фермента *транскриптазы*.

Некоторые РНК-геномные вирусы могут содержать как «+», так и «-» нити РНК (*±РНК*). Такие вирусы называют *амбисенсвирусами*.

**Структурно-функциональная организация вирусного генома.** ДНК-содержащие вирусы также, как прокариоты и эукариоты, имеют структурные гены, кодирующие белки-ферменты, и регуляторные гены, детерминирующие образование репрессоров, подавляющих, в частности, функцию структурных.

Считывание информации с *оперонов* контролируется *энхансером* [англ. *enhancer*] или усилителем транскрипции; *промотором* [лат. *promotum*, продвигать], ответственным за ее инициацию (начало), с которым связывается фермент РНК-полимераза, осуществляющая транскрипцию ДНК; *оператором* [от лат. работник], регулирующим транскрипцию оперона (или отдельных генов) и *терминатором* [лат. *terminare*, ограничивать], прекращающим ее. При этом регуляторные участки оперона представляют собой короткие последовательности нуклеотидов ДНК; энхансер, промотор и оператор расположены в его начале (перед структурными генами), а терминатор – в конце.

В *структурных генах* вирусных оперонов, как и в клетках эукариот, имеются *кодируемые участки* нуклеотидных последовательностей, несущих информацию (*экзоны*), и *некодируемые вставочные последовательности (интроны)*, которые после транскрипции в процессе созревания (процессинга) иРНК вырезаются с одновременным считыванием экзонов, что называется сплайсингом [англ. *splice*, соединять, сращивать].

**Кодирующая способность вирусного генома.** Число генов в вирусных геномах колеблется от 3–4 у самых простых вирусов до многих десятков у сложно устроенных. Увеличение генетической информации при минимальном содержании генетического материала происходит за счет того, что:

1) вирусные иРНК в отличие от иРНК про- и эукариот могут направлять синтез не одного, а двух-трех белков. Достигается это двухкратным считыванием одной и той же иРНК с находящихся в ней в разных участках двух-трех иницирующих АУГ-кодонов. Образующиеся полипептиды с разных иницирующих кодонов будут копиями, отличающимися только длиной;

2) при сдвиге рамки считывания на один или два нуклеотида и появлении нового генетического кода молекула иРНК может транслироваться с образованием таких полипептидов, у которых нет идентичных аминокислотных последовательностей. Такие белки называют *уникальными белками*;

3) нередко у вирусов происходит трансляция гигантских полипептидов-предшественников с последующим нарезанием их на более мелкие;

4) относительно невысокий уровень генетической информации вирусов компенсируется исключительно точным механизмом переключения с репликации на транскрипцию и наоборот, что особенно ярко проявляется при репродукции РНК-содержащих вирусов.

### 3.3 Типы вирусных мутантов и взаимодействия между вирусами

Наряду с полными вирионами в процессе репродукции формируются необычные по структуре и функции вирусные частицы, которые можно объединить в три группы: псевдовirusы, вирусы-мутанты и вирусы-рекомбинанты. Псевдо- и мутантные вирионы возникают в чистых и смешанных культурах вирусов, а рекомбинантные – только в смешанных.

*Псевдовirusы* представлены вирусными капсидами. Среди псевдовirusов различают:

- *неполные псевдовirusионы* (*вирусы-пустышки*, или «*вирусные тени*») – полые капсиды, не содержащие вирусного генома;
- *псевдовirusионы*, капсиды которых вместо вирусного генома содержат нуклеиновую кислоту клетки-хозяина.

**Типы вирусных мутантов.** В репродуктивных циклах вирусов закономерно появляются вирусные *гибриды-мутанты* [лат. *mutation*, изменение], по структуре и фенотипу отличающиеся от родительского (дикого) типа, но имеющие его генетическую основу, и *немутационные гибриды*.

Термин «*мутант*» («тип», «штамм», «вариант») обозначает вирус, который отличается каким-то наследуемым признаком от родительского «дикого» вируса. «*Дикий тип*» — это условное обозначение определенной популяции, которое обычно применяют к ней только в связи с исследуемой мутацией, например температуростойчивость. При этом дикий тип может содержать иные мутации.

*Штаммом* называют различные дикие типы одного вируса, например штаммы Орсе́й и Нью-Джерси вируса везикулярного стоматита. Термин «*тип*» является синонимом «серотип», который определяют по

нейтрализации инфекционности (специфическими антителами), например серотипы реовируса 1, 2 и 3.

Различают спонтанную и индуцированную мутации вирусов.

**Индукцированная мутация.** Большая часть мутантов получена из популяций дикого типа, обработанных мутагенами, например, азотистой кислотой, гидроксиламином, алкилирующими агентами, ультрафиолетовым облучением.

**Спонтанная мутация.** Некоторые вирусы дают значительную долю мутантов при пассировании в отсутствие каких-либо мутагенов. Эти спонтанные мутации накапливаются в геномах вирусов и приводят к изменению фенотипа. *В основе спонтанного мутагенеза лежит «ошибочное» спаривание азотистых оснований, обусловленное существованием двух таутомерных [греч. *tauto* – те же самые, *meros* – часть] форм азотистых оснований.* Во время репликации вирусов спаривание правильного азотистого основания с основанием в таутомерной форме приводит к простой замене (*транзиции*) пурина на пурин или пиримидина на пиримидин. Скорости спонтанного мутагенеза в ДНК-геномах низки –  $10^{-8}$ – $10^{-11}$  на каждый включенный нуклеотид. Например, для вируса оспы кроликов обнаружено менее 0,1 % спонтанных *ts*-мутантов. У РНК-содержащих вирусов скорость спонтанного мутагенеза значительно выше –  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  на каждый включенный нуклеотид. Для вируса везикулярного стоматита частота перехода к *ts*-фенотипу равна 1–5 %.

Появляющиеся мутанты, как правило, являются делеционными (лат. *deletion*, выпадение), т. е. утрачивающими определенный участок генома родительского вируса. Вирусные частицы с таким дефектным геномом сохраняют свою активность, но для репликации и созревания нуждаются в продуктах вирусного генома родителя – обычно в структурных и неструктурных белках. Такой характер воспроизводства вирусов называют *негенетическим типом взаимодействия* или *односторонней комплементацией* (дополнением); родительский вирус, стимулирующий репродукцию мутанта, – *вирусом-помощником*, а репродуцирующийся с его помощью мутант – *вирусом-сателлитом* (*спутником*).

В соответствии с этим различают 4 класса вирусов-мутантов: 1) вирусы с условно дефектными геномами; 2) ДИ-частицы, т. е. дефектные интерферирующие; 3) интеграционные вирусы с дефектными геномами; 4) вирусы-сателлиты.

*Условно-дефектные вирусы несут мутантные геномы, дефектные в определенных условиях.* Среди них чаще всего встречаются температурочувствительные *ts*- и холодоочувствительные *tc*-мутанты, мутанты по спектру хозяев и мутанты по морфологии бляшек.

У *ts*-мутантов нуклеотидная последовательность в геноме изменяется таким образом, что образованный ими белковый продукт сохраняет функционально активную конформацию только при перmissive [англ.

*permissive*, разрешающий] температуре около 36–38°C, а при более высокой непермиссивной температуре 39–42°C мутант становится нежизнеспособным и прекращает развитие. Наоборот, *tc*-мутанты размножаются при более высокой, чем оптимальная, пермиссивной для них температуре.

*Дефектные интерферирующие вирусы, или ДИ-частицы*, представляют собой вирионы, у которых отсутствует некоторая часть геномной РНК или ДНК, но структурные белки остаются такими же, как у родительских вирусов. Репликация ДИ-частиц без родительских вирионов не происходит, но при *совместном заражении* клеток теми и другими она восстанавливается вследствие использования генных продуктов дикого типа, которых они сами не вырабатывают. Для ДИ-частиц родительский вирус с полноценным геномом является вирусом-помощником (*хелпером*). Название ДИ-частиц обусловлено тем, что утилизируя для своей репликации продукты генов хелпера, они вместе с тем угнетают репродукцию вируса-помощника, что в вирусологии называют *интерференцией* [лат. *inter*, взаимно и *ferio*, подавлять].

*Интеграционные вирусы с дефектным геномом* – это мутанты-типы (или виды) ретровирусов подсемейства *онкорнавирусов*, содержащие *onc-гены* [греч. *oncos*, опухоль и англ. RNA – РНК], – прежде всего саркомные вирусы-гибриды, которые в процессе эволюции, как предполагают, приобрели клеточные *onc-гены*. Интегрируя с клеточным геномом, ДНК-транскрипты саркомных вирусов привносят в него *onc-гены* и, если они попадают под действие определенной регуляции клеток, после короткого латентного периода вызывают злокачественное их перерождение.

*Вирусы-сателлиты*. Так же, как ДИ-частицы, они паразитируют на генных продуктах вируссов-помощников и часто интерферируют с ними, как, например, сателлит вируса некроза табака, полностью зависящий в своей репликации от одновременного заражения клеток табака его инфекционным вирусом-помощником.

Однако вирусы-сателлиты часто используют генные продукты неродственных им вируссов-помощников с негомологичными геномами.

***Генетическое взаимодействие между вирусами.*** Различают два типа генетического взаимодействия между вирусами: комплементация и рекомбинация.

*Комплементацией* называют взаимодействие генных продуктов вируса в смешанных вирусных культурах клеток, которое приводит к увеличению выхода одного или обоих вирусов, в то время как их генотип остается неизменным.

Существует два типа комплементации:

1) *неаллельная*, или межгенная (наиболее типичная), при которой мутанты, дефектные по различным функциям, помогают друг другу в репликации, предоставляя функцию, дефектную у другого вируса;

2) *аллельная*, или *внутригенная* (наблюдается намного реже), которая происходит в том случае, если генный продукт, дефектный у обоих партнеров в разных доменах, образует мультимерный белок. Если такой белок состоит из субъединиц одного партнера, то он функционально неактивен, а если из субъединиц обоих партнеров, то он может принять функционально активную конформацию.

*Вирусной рекомбинацией* называют обмен генетическим материалом (отдельных участков и целых генов) между двумя вирусами с разными геномами или же вариантами одного и того же вируса, различающимися некоторыми структурными особенностями их генома. Вирус, в геноме которого при рекомбинациях произошло замещение-добавление определенного участка ДНК, называют *вирусом-реципиентом (рекомбинантом)*.

Биологическое значение рекомбинаций: они не нарушают структуры вирусного генома (в отличие от мутаций, они не летальны), а обновляют его или устраняют имеющиеся повреждения, обогащают при этом генетический фонд вирусов и вносят существенный вклад в их эволюцию.

Внутримолекулярные рекомбинации у вирусов реализуются механизмом разрыв-воссоединение, а у РНК-вирусов с сегментированным геномом – перемешиванием генов.

Среди генетических рекомбинаций ДНК-вирусов выделяют рекомбинации:

1) *между двумя дикими типами вирусов с интактными* (лат. *intactus*, нетронутый), т. е. полными, *геномами*. Рекомбинации между дикими типами могут быть межгенными с передачей генов и внутригенными с обменом отдельных участков гена. При этом образующийся *вирус-рекомбинант* наследует свойства обоих типов вирусов;

2) *между диким типом и его мутантным вариантом*. Формирование рекомбинантов происходит на основе мутантов. В частности, рекомбинация между интактным геномом дикого типа и дефектным геномом его мутанта устраняет повреждение в результате скрещивания полного и дефектного геномов вирусов – перекрестная, или кросс-реактивация. Так как при этом восстанавливается утраченный признак (маркер), то ее нередко именуют *феноменом «спасения маркера»*;

3) *между вариантами мутантов дикого типа вируса*. Формирование рекомбинантов происходит на основе мутантов. Также наблюдается реактивация повреждений геномов, но так как ее эффективность всецело зависит от количества и тесного кооперативного взаимодействия между рекомбинирующими вирусами, то ее называют не перекрестной, а *множественной реактивацией*.

В рекомбинационном процессе между вирусами, имеющими полный сегментированный геном, происходит перетасовка (пересортировка) их фрагментов и образование рекомбинантов, содержащих родственные, но

не свойственные для дикого типа гены, например, гены гемагглютининов и нейраминидаз других сероваров вируса гриппа типа А.

Таким образом, в клетке, зараженной *смешанной культурой* родственных вирусов с интактными генами, возникают вирусы-рекомбинанты и реассортанты, а при одновременном ее инфицировании диким типом с его мутантом или несколькими мутантами-реактивантами.

Генетического взаимодействия между биологически и эволюционно далекими вирусами в природе не происходит вследствие их высокой специфичности по спектру клеток-хозяев и интерференции, т. е. *в естественных условиях из гетерогенных вирусных геномов гибридов не возникает*.

**Негенетическое взаимодействие вирусов.** Негенетические взаимодействия часто приводят к фенотипическому маскированию истинного вирусного генотипа и возникновению *немутационных гибридов*. К негенетическим взаимодействиям вирусов в частности относят *гетерозиготность, фенотипическое смешивание, интерференцию*.

Среди немутационных вирусов-гибридов различают вирусы-гетерозиготы и «вирусы-химеры».

*Вирусы гетерозиготы* (греч. *heteros*, иной, чужой и *zygoon*, соединять) представляют собой вирусные частицы, в состав которых входит не один, а два различных генома вирусов или один полный с некоторой частью второго. Образование гетерозигот сравнительно редкое явление.

«*Вирусы-химеры*» – это вирусные частицы, содержащие полный геном, заключенный в капсид, состоящий из белка другого вируса, что происходит при так называемом фенотипическом смешивании, или *транскапсидизации*. Фенотипическое смешивание довольно широко распространено среди близкородственных безоболочечных вирусов, таких, например, как вирусы полиомиелита типов 1 и 2, вирусов ЭКХО и Коксаки, других пикорнавирусов.

Таким образом, немутационные вирусы-гибриды – полноценные вирионы. Подобно вирусам-мутантам, возникают путем комплементации, а не вследствие скрещивания геномов, как рекомбинанты.

Состояния гетерозиготности и транскапсидизации вирусов неустойчивы и быстро исчезают при пассажах.

*Биологическое значение* немутационных гибридов: значение гетерозигот не выяснено. Транскапсидизация же может обеспечить вирусам-гибридам широкий круг хозяев и преодоление межвидовых барьеров.

### **3.4 Общие принципы выражения вирусного генома при репродукции вирусов**

В репродукционном цикле вирусов собственно репродуктивная стадия, включающая фазы транскрипции, трансляции и репликации, у разных групп вирусов и семейств неодинакова.

**Транскрипция** – первый этап реализации генетической информации вирусов.

У ДНК-содержащих семейств папова-, адено- и герпесвирусов, репродукция которых происходит в ядре, осуществляется клеточной РНК-полимеразой, а у репродуцирующихся в цитоплазме иридо- и поксвирусов – вирусоспецифической, попадающей в клетку вместе с их геномом.

Таким же вирусоспецифическим ферментом осуществляется акт транскрипции у РНК-содержащих вирусов с негативным геномом. В акте транскрипции для синтеза белка РНК-вирусы с позитивным геномом не нуждаются. Исключение составляют ретровирусы, у которых транскрипция происходит на интегрированных с клеточным геномом вирионных ДНК-транскриптах с помощью клеточных РНК-полимераз.

Характерной особенностью транскрипции у плюс-нитевых РНК-вирусов является кодирование синтеза одной длинной иРНК, а у ДНК-вирусов – многих, но более коротких.

**Трансляция.** На этом этапе происходит синтез вирусного белка. Трансляция начинается с узнавания клеточными рибосомами вирусных иРНК. Переключение на избирательную трансляцию вирусных иРНК часто связано с вирусным механизмом подавления трансляции иРНК клеток-хозяев.

В процессе трансляции у вирусов, кодирующих синтез одной длинной иРНК, синтезируется гигантский полипептид-предшественник, впоследствии нарезающийся на несколько различных белков, а у вирусов, кодирующих короткие иРНК, – соответствующее им число полностью созревших белков. Образующиеся вирусные белки часто подвергаются пост-трансляционным модификациям, например гликолизированию, ацилированию, метилированию, фосфорилированию.

**Репликация** ДНК-содержащих вирусов, или копирование их генома, представленного линейной двухцепочечной структурой, сходна с репликацией ДНК клеток и осуществляется их ДНК-полимеразами. Другими словами, синтез гомологичных нуклеиновых кислот происходит на обеих расплетенных цепях, в результате чего каждый вновь образующийся вирион получает ДНК, состоящую из старой цепи и ее новой копии. Следует, правда, подчеркнуть, что раскручиванию кольцевых двухцепочечных ДНК предшествует разрезание одной из ее нитей, а репликация однонитчатых ДНК-содержащих парвовирусов происходит после синтеза второй цепи ДНК и образования промежуточных двухцепочечных его форм.

Репликация вирусных РНК тоже происходит не на родительских, а на промежуточных комплементарных нитях, т. е. образованию новых геномных нитей предшествует синтез их двойников. При этом синтез тех и других нитей РНК, так же как иРНК, осуществляют вирусоспецифические РНК-полимеразы.

У вирусов, геном которых представлен двухцепочечной ДНК, механизм ее репликации обеспечивается ДНК-зависимой ДНК-полимеразой.

Особым свойством обладает геномная РНК ретровирусов, имеющих в своем составе *обратную (реверсальную) транскриптазу, или РНК-зависимую ДНК-полимеразу*. С помощью этого уникального вирусоспецифического фермента на ее матричной основе последовательно синтезируются вначале одна нить ДНК, затем и другая, которые, замкнувшись в кольцо, интегрируют с клеточным геномом, после чего с участием РНК-полимеразы клеток происходит переписывание информации на РНК. Поскольку синтезированная таким окольным путем иРНК не просто комплементарна геномной, как у минус-нитевых вирусов, а полностью гомологична ей, то ретровирусы с полным правом относят к «плюс-нитевым».

Синтезированный белок, который используется для строительства капсида, и размноженная во многих копиях вирусная ДНК объединяются и формируют новые, «дочерние» вирионы. Сформированное вирусное потомство покидает использованную клетку и заражает новые: цикл репродукции вируса повторяется.

У некоторых ДНК-содержащих вирусов сам цикл репродукции в клетке не связан с немедленной репликацией вирусной ДНК; вместо этого вирусная ДНК встраивается (интегрируется) в ДНК клетки-хозяина. На этой стадии вирус как единое структурное образование исчезает: его геном становится частью генетического аппарата клетки и даже реплицируется в составе клеточной ДНК во время деления клетки. Однако впоследствии, иногда через много лет, вирус может появиться вновь – запускается механизм синтеза вирусных белков, которые, объединяясь с вирусной ДНК, формируют новые вирионы.

### **Вопросы для самоконтроля**

- 1 Какие типы вирусных геномов существуют?
- 2 Какие структурные особенности имеют РНК и ДНК вирусного происхождения?
- 3 Какова структурно-функциональная организация вирусного генома?
- 4 Что определяет кодирующую способность вирусного генома?
- 5 Какие типы вирусных мутантов различают?
- 6 Что собой представляют ДИ-частицы?
- 7 Какие генетические взаимодействия существуют между вирусами?
- 8 Какие негенетические взаимодействия существуют между вирусами?
- 9 Назовите этапы репликации ДНК и РНК вирусов.

## Лабораторное занятие 4

### Организация геномов вирусов и выражения вирусного генома при репродукции вирусов

*Цель занятия:* изучить особенности организации вирусных геномов и общие принципы выражения геномов при репродукции вирусов.

*Материалы:* демонстрационные таблицы (рисунки) со схемами процесса репродукции вирусов с разными типами геномов.

**Задание 1:** проведите анализ особенностей строения вирусного генома

Ход работы

В протоколе занятия:

- 1 составьте графологическую схему «Типы вирусных геномов»;
- 2 назовите и изобразите в виде рисунков разнообразие форм структуры ДНК- и РНК-геномов;
- 3 дайте письменные ответы на вопросы задания 1;
- 4 составьте общую схему функциональной организации вирусных геномов.

**Задание 2:** проведите анализ механизмов образования репродуктивных тип-вариантов вирусов.

Ход работы

В протоколе занятия:

- 1 составьте графологическую схему «Репродуктивные тип-варианты вирусов»;
- 2 составьте таблицу «Механизмы образования репродуктивных тип-вариантов вирусов»:

Типо-вариант вируса	Механизм (причина) появления тип-варианта

**Задание 3:** изучите общие принципы выражения генома при репродукции вирусов.

Ход работы

1 Рассмотрите рисунки на таблицах, изображающие этапы репродукции вирусов с различными типами геномов. Обратите внимание на особенности реализации генетической информации у вирусов с разными геномами.

2 В протоколах занятий под соответствующими рисунками дайте названия этапам репродукции вирусов с разными типами геномов.

3 Составьте и изобразите в протоколе занятия схемы репродукции вирусов в зависимости от типа генома.

## Тема 4 Взаимодействие вирусов с клеткой – хозяином

### 4.1 Формы взаимодействия вирусов с клеткой

### 4.2 Формы продуктивности инфекции

### 4.3 Стадии репликации вирусов

#### 4.1 Формы взаимодействия вирусов с клеткой

*Репродукцией* (лат. *production*, производство) вирусов называют процесс размножения вирусных частиц в чувствительных к ним клетках. Репродуцируются в них не все вирусы, а только вирулентные, обладающие высокой степенью патогенности. У интеграционных вирусов способность к репродукции возникает после исключения (отщепления) их генома от генома клеток.

Вирусы не способны к самостоятельному размножению. Синтез вирусных белков и воспроизведение копий вирусного генома обеспечивают биосинтетические процессы клетки-хозяина. Для вирусов характерен *дизъюнктивный* (разобщённый) *тип репродукции*, осуществляемый при взаимодействии вируса с инфицируемой клеткой – белковые макромолекулы и нуклеиновые кислоты образуются отдельно, после чего происходит сборка дочерних популяций. Реализация репродуктивного цикла в существенной степени зависит от типа инфицирования клетки и характера взаимодействия вируса с чувствительной (могущей быть инфицированной) клеткой.

Известны следующие типы взаимодействий «вирус-клетка»: продуктивный (образуется дочерняя популяция), интегративный (виrogenия), абортивный (дочерняя популяция не образуется) и интерференция вирусов (инфицирование чувствительной клетки разными вирусами).

**Продуктивное взаимодействие** «вирус – клетка» чаще носит *литический характер*, то есть заканчивается гибелью и лизисом инфицированной клетки, что происходит после полной сборки дочерней популяции. Гибель клетки вызывают следующие факторы: раннее подавление синтеза клеточных белков, накопление токсических и повреждающих клетку вирусных компонентов, повреждение лизосом и высвобождение их ферментов в цитоплазму.

**Интегративное взаимодействие**, или **виrogenия**, не приводит к гибели клетки. Нуклеиновая кислота вируса встраивается в геном клетки-хозяина и в последующем функционирует как его составная часть. Наиболее яркие примеры подобного взаимодействия – лизогения бактерий и вирусная трансформация клеток.

**Абортивное взаимодействие** не приводит к появлению дочерней популяции и происходит при взаимодействии вируса с покоящейся клеткой (стадия клеточного цикла G<sub>0</sub>) либо при инфицировании клетки вирусом с изменёнными (дефектными) свойствами. Следует различать *дефектные вирусы* и *дефектные вирионы*. Первые существуют как самостоятельные

виды и функционально неполноценны, так как для их репликации необходим «вирус-помощник» (например, для репликации аденоассоциированного вируса необходимо присутствие аденовирусов). Вторые составляют дефектную группу, формирующуюся при образовании больших дочерних популяций (например, могут образовываться пустые капсиды либо безоболочечные нуклеокапсиды). Особая форма дефектных вирионов – *псевдовирионы*, включившие в капсид нуклеиновую кислоту клетки-хозяина.

**Интерференция вирусов** происходит при инфицировании клетки двумя вирусами. Различают гомологичную (при инфицировании клетки родственными вирусами) и гетерологичную (если интерферируют неродственные виды) интерференцию. Это явление возникает не при всякой комбинации возбудителей, иногда два разных вируса могут репродуцироваться одновременно (например, вирусы кори и полиомиелита). Интерференция реализуется либо за счёт индукции одним вирусом клеточных ингибиторов (например, ИФН), подавляющих репродукцию другого, либо за счёт повреждения рецепторного аппарата или метаболизма клетки первым вирусом, что исключает возможность репродукции второго.

#### 4.2 Формы продуктивности инфекции

По характеру взаимодействия генома вируса с геномом клетки выделяют *автономное* (геном вируса не интегрирован в геном клетки) и *интеграционное* (геном вируса интегрирован в геном клетки) *инфицирование*. Особую форму составляют латентное и персистирующее инфицирование.

**Латентное инфицирование.** ДНК некоторых вирусов (герпесвирусы, ретровирусы) может находиться в клетке вне хромосом, либо вирусная ДНК интегрируется в ядерный геном, но вирусспецифические синтезы не происходят. Такая вирусная ДНК образует латентный *провирус*, реплицирующийся вместе с хромосомой. Подобные состояния вирусной ДНК нестабильны, возможны периодические реактивации с переходом в продуктивное взаимодействие «вирус – клетка», либо клетка трансформируется, давая начало злокачественному росту.

**Персистирующее инфицирование.** Некоторые РНК-вирусы могут вызывать персистирующие инфекции. При этом происходит постепенное выделение вирусных частиц, но инфицированная клетка не лизируется. Нередко дочерние популяции вирионов дефектны. Иногда такие хронические поражения у человека протекают без клинических проявлений. В частности, вирус гепатита В способен вызывать персистирующее поражение гепатоцитов с развитием хронического гепатита.

#### 4.3 Стадии репликации вирусов

В цикле репродукции вирусов различают четыре стадии: 1) *подготовительную*, или инициальную, включающую фазы адсорбции вируса на клетке, проникновения и раздевания в клетке; 2) *собственно*

репродуктивную стадию образования структурных белков и вирионных нуклеиновых кислот; 3) сборку вирионов; 4) заключительную, сопровождающуюся выходом зрелых вирусных частиц из клетки (рисунок 30).

**Адсорбция.** Первая стадия репродуктивного цикла — адсорбция вириона на поверхности инфицируемой клетки. Адсорбция происходит путём взаимодействия вириона со специфическими клеточными рецепторами. Понятие «тропизм вирусов» объясняется специфическим взаимодействием вирусных белков с поверхностными рецепторами инфицируемой клетки.

Процесс адсорбции протекает в две фазы: фаза ионного притяжения обусловлена неспецифическим взаимодействием, фаза прикрепления происходит благодаря структурной гомологии либо комплементарности взаимодействующих молекул.

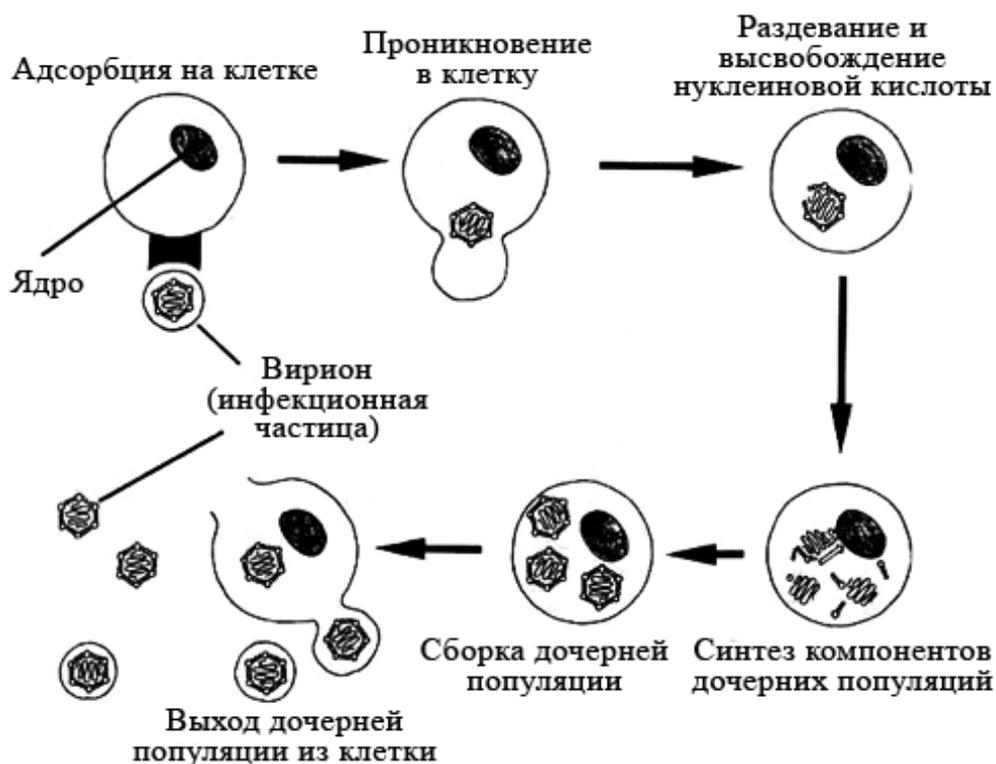


Рисунок 30 – Основные этапы репродукции вирусов

Количество инфекционных вирусных частиц, адсорбированных на клетке, определяет термин «множественность заражения» (инфицирования), то есть на клетке может сорбироваться большое количество вирионов. Однако, инфицированная вирусом клетка обычно толерантна к повторному заражению гомологичным вирусом.

**Проникновение и «раздевание».** «Голые» вирусы проникают в клетку путём эндоцитоза (*виropексис* [вирус + греч. *rexis*, прикрепление]) – погружения участка клеточной мембраны в месте их адсорбции. «Одетые»

вирусы проникают в клетку путём слияния суперкапсида с клеточной мембраной при участии специфических F-белков (белков слияния). При проникновении «голых» вирусов в клетку образуются вакуоли (эндосомы). После проникновения «одетых» вирусов в цитоплазму происходит частичная депротеинизация вирионов и модификация их нуклеопротеида (*раздевание*). Модифицированные частицы теряют инфекционные свойства.

**Теневая фаза.** После депротеинизации вирусы невозможно выделить из культуры клеток. Этот этап репродукции известен как теневая фаза, или *фаза эклипса* [от англ. *eclipse*, затмение]. Она включает репликацию нуклеиновых кислот вируса и синтез вирусных белков. Теневая фаза не происходит при температуре 0–4 °С (исключая вирус гриппа). Теневая фаза заканчивается после образования составных компонентов вируса, необходимых для сборки дочерних популяций.

**Сборка.** У просто устроенных вирусов, состоящих из нуклеиновой кислоты и нескольких белков, сборка состоит из упорядоченного взаимодействия этих молекул. У сложно устроенных вирусов сборка дочерних популяций протекает многоступенчато. Взаимодействие нуклеиновых кислот с внутренними и оболочечными белками приводит к образованию нуклеокапсидов. В процессе образования «одетых» вирусов полные нуклеокапсиды упорядоченно выстраиваются с внутренней стороны клеточной мембраны под участками, модифицированными оболочечными вирусными белками (М-белками).

**Высвобождение дочерних вирионов.** Вирусы, лишённые суперкапсида, и поксвирусы обычно высвобождаются быстро; выход дочерних популяций сопровождается разрушением цитоплазматической мембраны и лизисом клетки. Вирусы, содержащие суперкапсид, высвобождаются медленнее. Модифицированные участки мембраны с заключёнными в них вирионами выпячиваются наружу и затем отпочковываются. При высвобождении почкованием изменённая клетка иногда может сохранять жизнеспособность.

### Вопросы для самоконтроля

- 1 Какие формы взаимодействия вирусов с клеткой различают?
- 2 Какие формы продуктивности инфекции существуют?
- 3 Назовите стадии репликации вирусов?
- 4 Охарактеризуйте начальную стадию репликации.
- 5 Каким способом вирусы могут проникать в клетку хозяина и от чего это зависит?
- 6 Как происходит синтез структурных элементов вириона?
- 7 Почему одну из фаз репликации вирусов называют «теневой фазой»?
- 8 Как происходит высвобождение дочерних популяций простых и сложных вирусов?
- 9 Как реализуется кодирующая стратегия вирусов в зависимости от организации генома?

## Лабораторное занятие 5

### Взаимодействие вирусов с клеткой-хозяином

**Цель занятия:** Изучить формы взаимодействия вирусов с клеткой-хозяином и формы продуктивности вирусной инфекции.

**Материалы:** 1) электронные микрофотографии разных стадий репродукции простых и сложных вирусов; 2) электронные микрофотографии или рисунки репродукции вирусов с репликацией генома: а) в цитоплазме, б) в ядре; 3) электронные микрофотографии или рисунки с изображением выхода из клетки хозяина дочерних популяций простых и сложных вирусов.

**Задание 1:** обобщите учебный материал по формам взаимодействия «вирус – клетка».

Ход работы

1 Составьте графологическую схему «Формы взаимодействия «вирус – клетка». Отрадите в этой схеме формы продуктивности вирусной инфекции.

2 Составьте таблицу «Механизмы взаимодействия «вирус – клетка»:

Форма взаимодействия «вирус – клетка»	Механизм взаимодействия

3 Составьте таблицу «Механизмы разных форм продуктивности вирусной инфекции»:

Форма продуктивности вирусной инфекции	Механизм возникновения данной формы вирусной инфекции

**Задание 2:** изучите этапы взаимодействия «вирус-клетка» при продуктивной инфекции.

Ход работы

1 Рассмотрите электронные микрофотографии разных стадий репродукции вирусов.

2 Составьте таблицу «Этапы репродукции вирусов». В таблице отразите особенности репродукции простых и сложных вирусов.

Название этапа, фазы	Протекание процесса	
	у простых вирусов	у сложных вирусов

3 Сделайте рисунок «Этапы репродукции вирусов». Обозначьте на этом рисунке этапы репродукции.

4 Дайте письменные ответы на поставленные в протоколе занятия вопросы.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМ.Ф.СКОРИНЫ

## Литература

- 1 Авакян, А. А. Атлас анатомии и онтогенеза вирусов человека и животных. / А. А. Авакян, А. Ф. Быковский. – Москва, 1970. – 240 с.
- 2 Атлас вирусной цитопатологии. /А.Ф.Быковский [и др.]; под ред. М. В. Жданова. – М. : «Медицина», 1975. — 260 с.
- 3 Вирусология: в 3-х томах. / под редакцией Б. Филдса, Д. Найпа. – Т. 1 – М. : Мир, 1989. – 499 с.  
Т. 2 – М.: Мир, 1989. – 248 с.  
Т. 3 – М.: Мир, 1989. – 246 с.
- 4 Вирусология: учебно-методическое пособие. / Л. П. Титов [и др.]. – Мн.: БГМУ, 2003. – 76 с.
- 5 Классификация и номенклатура вирусов позвоночных. / Д. А. Васильев [и др.]. – Ульяновск, 1999. – 22 с.
- 6 Коротяев, А. И. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. / Коротяев А. И., Бабичев С. А. – М. : ООО «Медицинское информационное агенство», 2001. – 736 с.
- 7 Павлович, С. А. Основы вирусологии: учебное пособие. / Павлович С. А. – Мн. : Выш. шк., 2001. – 192 с.
- 8 Поздеев, О. К. Медицинская микробиология: учебник для вузов. / О. К. Поздеев. – М. : ГЕОТАР–МЕД, 2002. – 768 с.