

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

Методы заражения куриного эмбриона.



Подготовила: преподаватель Угышева Ш.Е.

Термин “**вирус**” означает
“яд”.

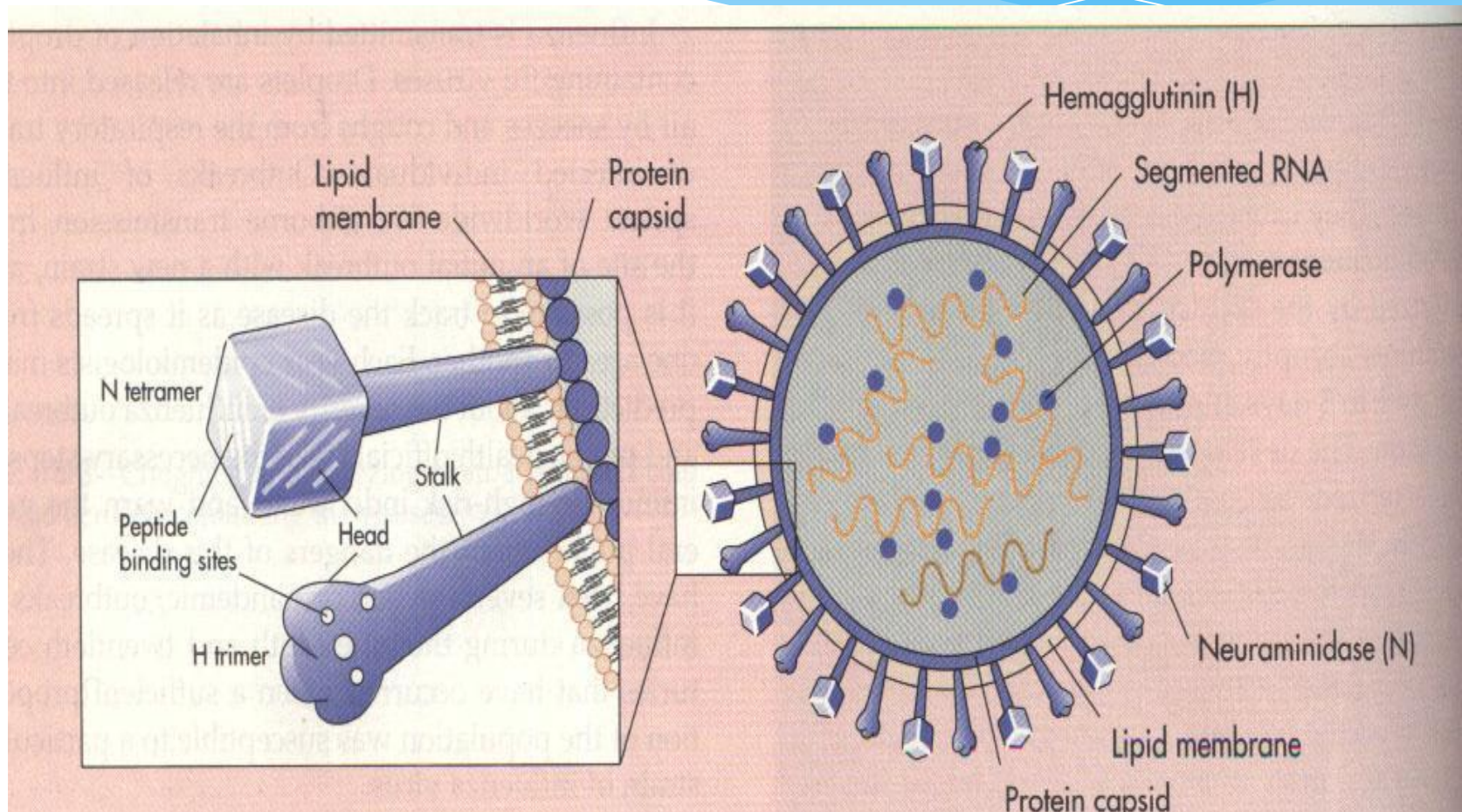
Вирусы - это неклеточные системы живых существ, которые отличаются своими малыми размерами, отсутствием в вирионе белоксинтезирующих и энергогенерирующих систем, а также облигатным внутриклеточным паразитизмом.

Целая вирусная частица называется – вирионом.

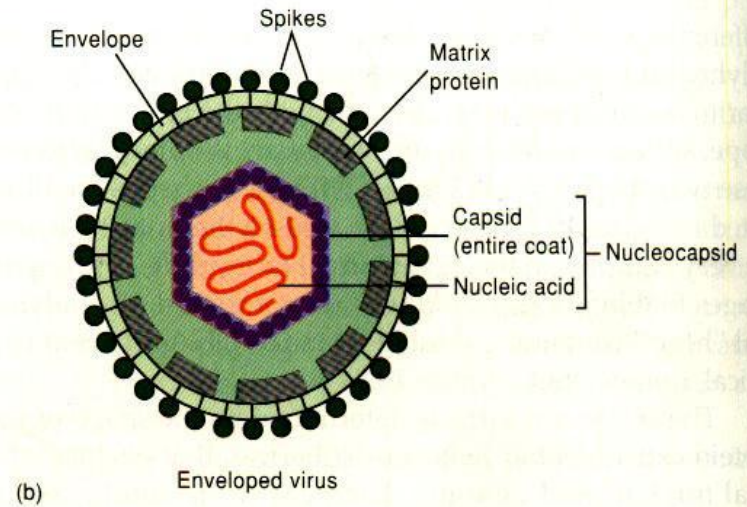
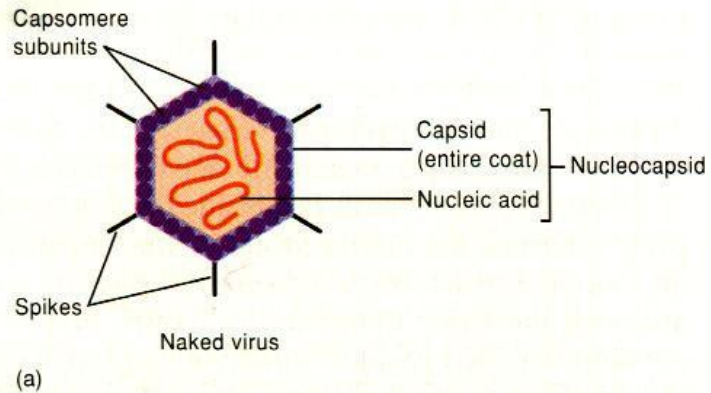


12 февраля 1892 Д. И. Ивановский откр
ыл
вирус табачной мозаики (ВТМ)

Строение вирусов



Структура вирусов



А – простой вирус

В – сложный вирус

За своей степенью опасности вирусы разделяют на четыре группы:

*** I группа:** возбудители лихорадки Эбола, Ласса, Марбурга, Мачупо, натуральной оспы, а также вирус гепатита В (мартышек).

II группа: арбовирусы, некоторые аренавирусы, вирусы бешенства, вирусы гепатита С и В человека, ВИЧ.

III группа - вирусы гриппа, полиомиелита, энцефаломиокардита, осповакцины.

IV группа - аденовирусы, коронавирусы, герпесвирусы, реовирусы, онковирусы.

Классификация вирусов

ДНК-содержащие вирусы

- * **Hepadnaviridae**
- * **Parvoviridae**
- * **Papovaviridae**
- * **Adenoviridae**
- * **Herpesviridae**
- * **Poxviridae**
- * **Iridoviridae**

РНК-содержащие вирусы

- * **Picornaviridae**
- * **Caliciviridae**
- * **Togaviruses**
- * **Flaviviridae**
- * **Coronaviridae**
- * **Rhabdoviridae**
- * **Filoviridae**
- * **Paramyxoviruses**
- * **Orthomyxoviruses**
- * **Arenaviridae**

Принципы классификации вирусов

- Тип нуклеиновой кислоты, ее структура, стратегия репликации
- Размеры, морфология, симметрия вириона, число капсомеров, наличие суперкапсида.
- Наличие специфических ферментов, особенно РНК- и ДНК-ПОЛИМЕРАЗ, нейраминидазы
- Чувствительность к физическим и химическим агентам, особенно к эфиру
- Иммунологические свойства
- Естественные механизмы передачи
- Тропизм к хозяину, его тканям и клеткам
- Патология, формирования включений
- Симптоматология заболеваний.

Классификация вирусов (РНК-содержащие)

Семейство вирусов	Наличие супер-капсида	Тип симметрии	Структура РНК	Вирусы патогенные для человека
Filoviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “минус”	Вирус Эбола, вирус Марбурга
Coronaviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая, линейная, не-сегментированная, “плюс”	Коронавирусы
Arenaviridae	Да	Спиральный	Однонитчатая циркулярная, 2 сегменты, “минус”	Вирус лимфоцитарного хориоменингита
Bunyavirus	Да	Спиральный	Однонитчатая циркулярная, 3 сегменты, “минус”	Хантавирусы, вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, вирус геморрагической лихорадки с почечным синдромом

Классификация вирусов (ДНК- **содержащие**)

Parovaviridae	Нет	Кубический	Двухнитчатая, циркулярная	Вирус папилломы
Adenoviridae	Нет	Кубический	Двухнитчатая, линейная	Аденовирус
Hepadnavirus	Да	Кубический	Двонитковая, дефектная, циркулярная	Вирус гепатита В
Herpesviridae	Да	Кубический	Двухнитчатая, линейная	Вирус простого герпеса 1, 2, опоясывающего герпеса-ветрянки, цитомегаловирус, Эпштейна-Барр вирус
Poxviridae	Да	Смешанный	Двухнитчатая, линейная	Вирус натуральной оспы, вирус вакцины
Parvoviridae	Нет	Кубический	Однонитчатая,, линейная	Вирусы гастроэнтерита, инфекционной эритемы, гемолитической болезни

Химический состав вирусов

В состав вирусов входит нуклеиновая кислота, белок, липиды, гликолипиды, гликопротеиды. Они всегда содержат один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), которая составляет от 1 % до 40 % массы вириона.

Вирусные геномы содержат информацию, достаточную для синтеза лишь нескольких белков. Их масса достигает 10-15 мг, что в 1 млн. раз меньше, чем в клетки, а длина - до 0,093 мм. Число нуклеотидных пар колеблется от 3150 (вирус гепатита В) до 230000 (вирус натуральной оспы). Белки вирусов (70-90 %) разделяются на структурные и неструктурные.

Структурными - белки, которые входят в состав зрелых внеклеточных вирионов.

Они выполняют ряд важных функций:

- защищают нуклеиновую кислоту от внешнего повреждения, взаимодействуют с мембранами чувствительных клеток, обеспечивают проникновение вируса в клетку - имеют РНК- и ДНК-полимеразную активность и др.

Неструктурные белки не входят в состав зрелых вирионов, однако образуются во время их репродукции.

Они:

- обеспечивают регуляцию экспрессии вирусного генома
- являются предшественниками вирусных белков, способны подавлять клеточный биосинтез.

В зависимости от расположения в вирионе, белки разделяются на капсидные, суперкапсидные, матриксные, белки сердцевин и ассоциируемые с нуклеиновой кислотой.

Липиды (15-35 %) содержатся в сложных вирусах и входят в состав суперкапсидной оболочки, образуя ее двойной липидный слой.

Они:

- стабилизируют вирусную оболочку
- обеспечивают защиту внутренних слоев вирионов от гидрофильных веществ внешней среды
- принимают участие в депротенинизации вирионов.

Репродукция вирусов.

Особенности ее заключаются в том, что геномы представлен как РНК, так и ДНК, они многообразные за структурой и формой, почти все вирусные РНК способны реплицироваться независимо от ДНК клетки. Вирусам присущий **дизъюнктивный** способ репродукции, **заключается в том, что синтез генома и белков вируса разорван в пространстве и времени:** нуклеиновые кислоты реплицируются в ядре клетки, белки - в цитоплазме, а сбор целых вирионов может происходить на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны. Репродукция вирусов - уникальная система воссоздания чужеродной информации в клетках эукариотов и обеспечивает абсолютное подчинение клеточных структур потребностям вирусов.

В репродукции вирусов выделяют ряд стадий.

К **ранним** принадлежит адсорбция вирусов на поверхности клетки, проникновение (пенетрация) их внутрь клетки и их раздевание (депротеинизация).

Поздние стадии (**стратегия вирусного генома**) включают **синтез** вирусных нуклеиновых кислот, синтез белка, сбор вирионов и выход вирусных частиц из клетки.

Прикрепление вирусов к поверхности клетки обеспечивается двумя механизмами: **неспецифическим и специфическим**.

Неспецифический определяется силами электростатического взаимодействия, что возникает между химическими группами на поверхности вирусов и клеток, которые несут разные заряды.

Специфический механизм (обратная и необоротная адсорбция) предопределяется комплементарными вирусными и клеточными рецепторами. Они могут иметь белковую, углеводную, липидную природу. Например, рецептором для вирусов гриппа является сиаловая кислота. Число рецепторов на участках адсорбции может достигать 3000. На поверхности вирусов рецепторы, как правило, расположены на дне углублений и щелей.

Проникновение вирусов внутрь клетки происходит за механизм **рецепторного эндоцитоза** (вариант виropексиса) на специальных участках клеточных мембран, которые содержат особый блок с высокой молекулярной массой - **клатрин**.

Мембраны инвагинируются, и образуются покрытые клатрином внутриклеточные вакуоли. их число может достигать 2000. Вакуоли, объединяясь, образуют **рецептосомы**, а последние сливаются с лизосомами. Поверхностные белки вирусов взаимодействуют с мембранами лизосом, а их нуклеопротеид выходит в цитоплазму.

Однако существует еще один механизм проникновения вирусов в клетку - **индукция слияния мембран**. Она происходит благодаря особому вирусному **белку слияния** (F-от fusion - слияние).

В результате этого процесса вирусная липопротеидная оболочка интегрируется с клеточной мембраной, а геном его проникает в клетку. Такой белок идентифицирован у вирусов гриппа, парогриппа, рабдовирусов и др.

Раздевание вирионов - многостепенный процесс, во время которого высвобождается их нуклеиновый аппарат, исчезают защитные оболочки, которые тормозят экспрессию генома. Происходит оно в специализированных участках - лизосомах, аппарате Гольджи. Поздние стадии репродукции направлены на синтез вирусных нуклеиновых кислот и белка.

Механизм **репликации** (образование вирусных геномов, которые являются точной копией предшественника) зависит от особенностей нуклеиновой кислоты. У разных видов вирусов он неодинаковый.

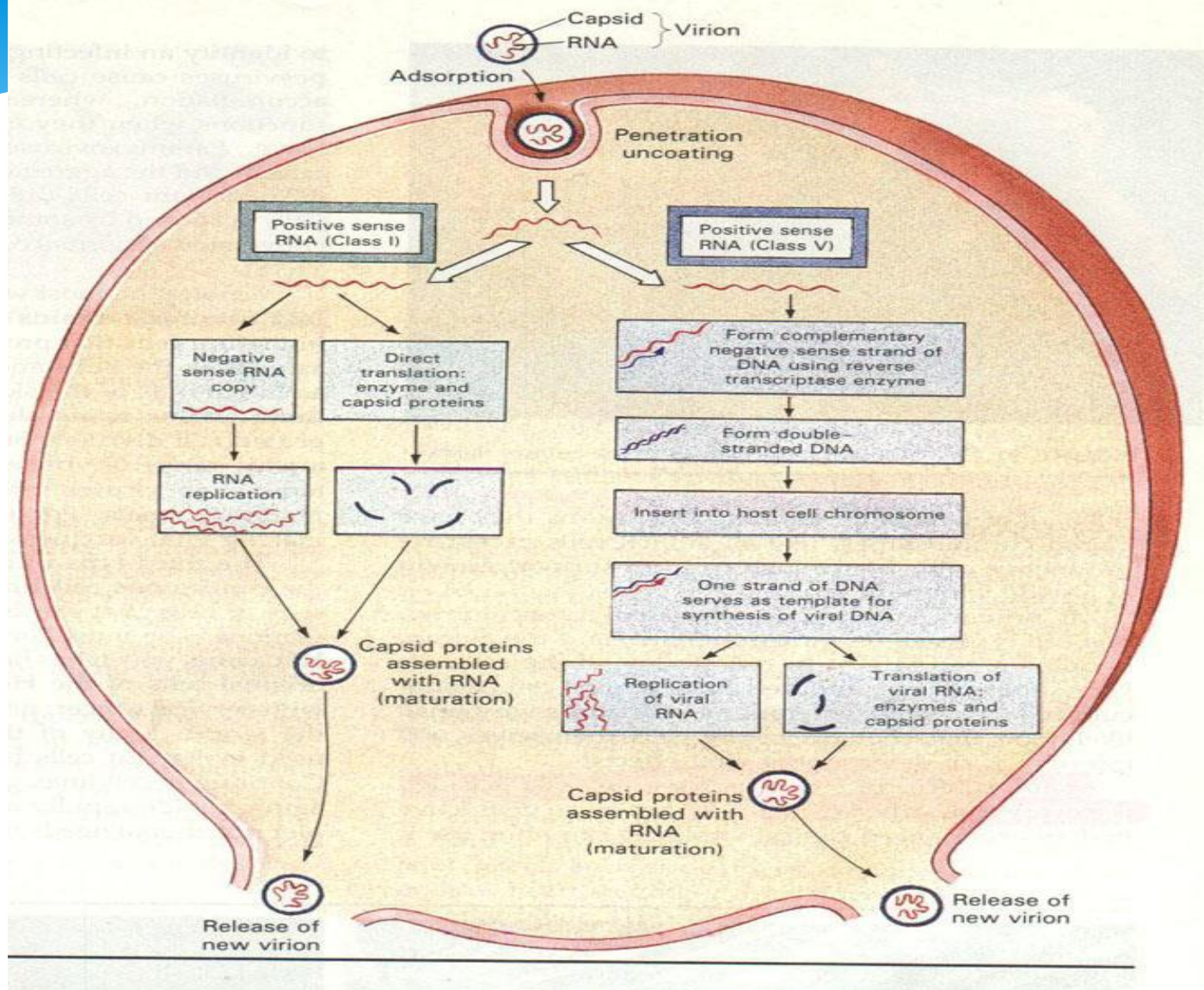
Репликация у вирусов, которые содержат РНК, происходит за подобными закономерностями. На материнской РНК синтезируется ИРНК, а матрицей для синтеза вирусного генома служат промежуточные формы РНК.

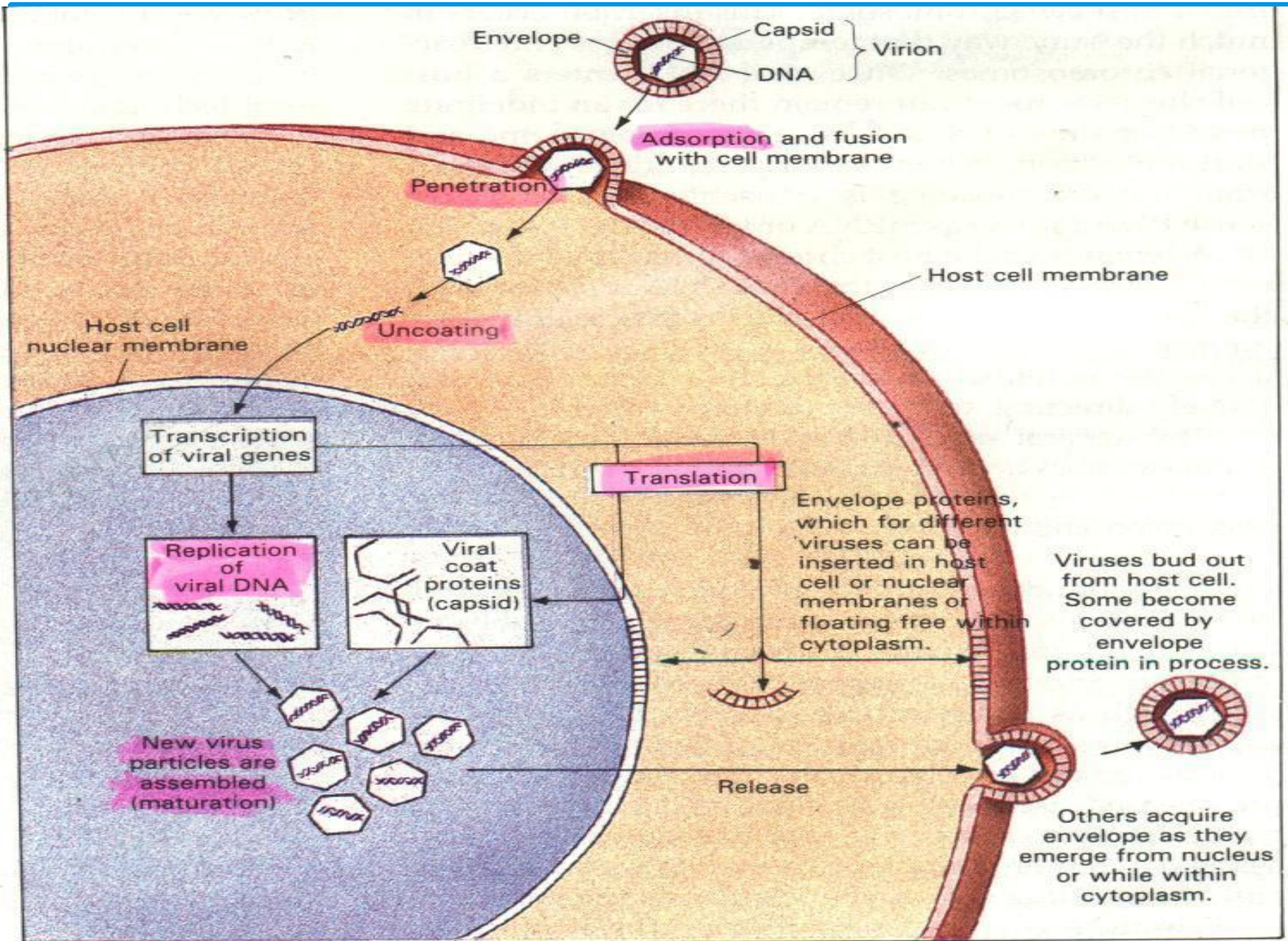
Транскрипцией называют процесс образования информационных (матричных) РНК.

Она происходит с помощью специальных ферментов, которые называются ДНК- или РНК-зависимые РНК-полимеразы.

У вирусов ДНК эти ферменты клеточного происхождения, а у РНК-вирусов - собственные вирусспецифические транскриптазы.

На стадии **трансляции** происходит считывание генетической информации из матричной РНК и перевод ее в последовательность аминокислот. Происходит процесс в рибосомах. Молекулы РНК продвигаются в рибосомах в соответствии с последовательностью триплетного кода, который распознают транспортные РНК. Последние несут на специальных участках аминокислоты.

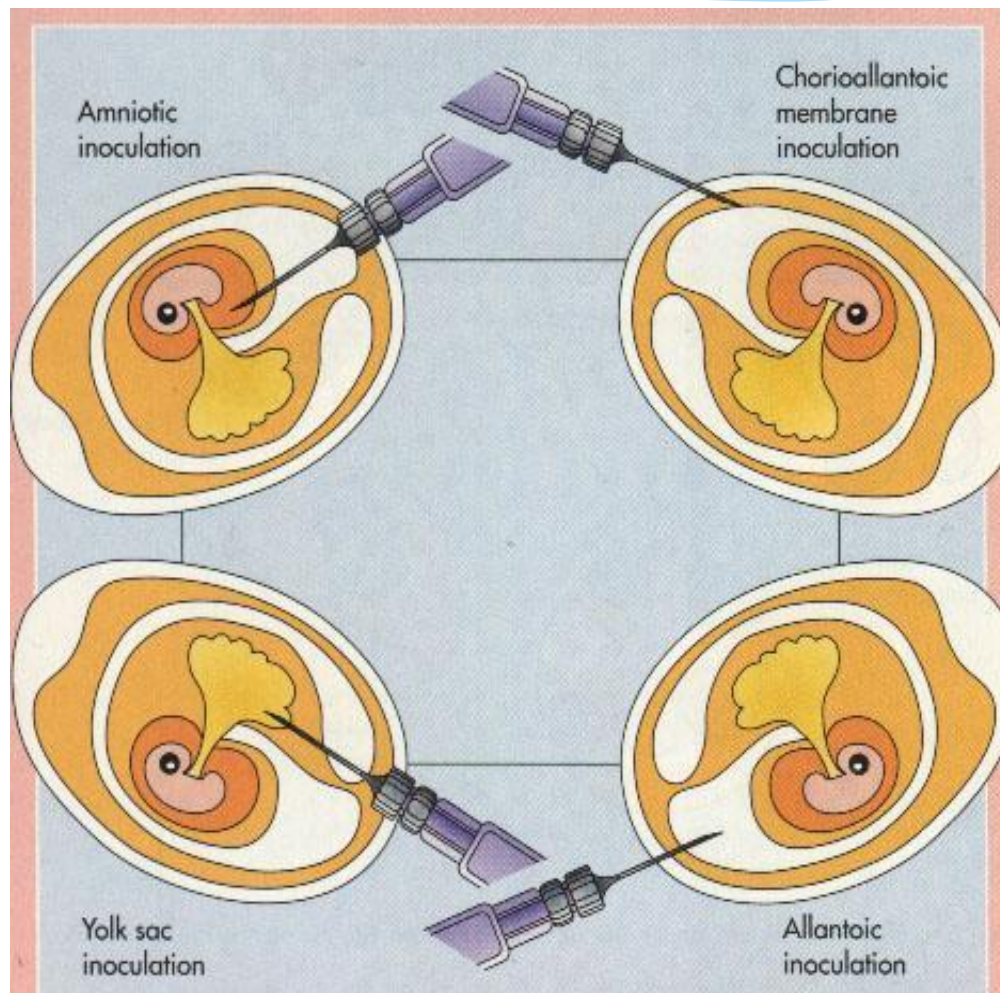




Культивирование вирусов

**Куриные эмбрионы
6-12 дневного
возраста.**

**Способы заражения -
открытый, закрытый**



Культивирование вирусов

Культуры клеток: - первично-трипсинизированные культуры эмбрионов человека, почек мартышек, фибробластов эмбриона курицы и тому подобное; способные расти на протяжении нескольких пассажей как вторичные культуры; перевиваемые клетки; они представляют собой культуры клеток, которые приобрели способность к неограниченному росту и размножению; Их получают из опухолей или из нормальных человеческих или животных тканей, которые имеют измененный кариотип. HeLa (карцинома шейки матки) Нер-2 (карцинома гортани человека), KB (карцинома ротовой полости человека), RD (рабдомиосаркома человека), RH (почка эмбриона человека), Vero (почка зеленой мартышки), СПЭВ (почка эмбриона свиньи), ВНК-32 (почка сирийского хомяка).

Культуры клеток

диплоидные клетки; они представляют собой культуры клетки одного типа, имеют диплоидный набор хромосом и способны выдерживать при этом до 100 пересеваний в условиях лаборатории. Они являются удобной моделью для получения вакцинных препаратов вирусов, так как свободные от контаминации инородными вирусами, хранят исходный кариотип во время пассажей, не имеют онкогенной активности.

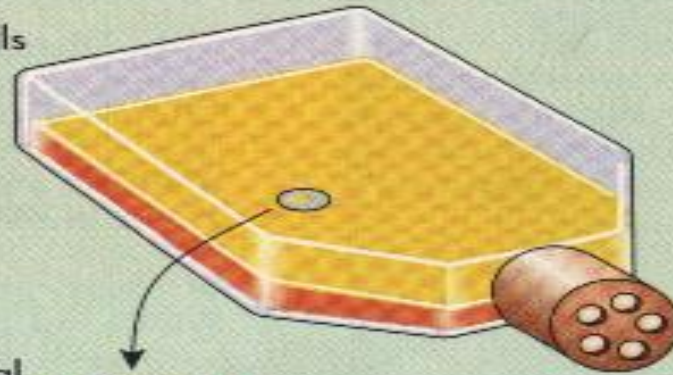
Чаще всего пользуются линиями культур, которые получены с фибробластов эмбриона человека (WI-38, MRC-5, MRC-9, IMR-90), коров, свиней, овец и тому подобное. Культуры клеток хранят в замороженном состоянии.

Питательные среды, которые используются для поддержки культур клеток или их роста бывают естественными или синтетическими (искусственными).

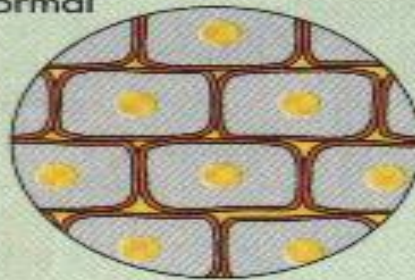
Естественные среды - сыворотка крови крупного рогатого скота, жидкости из серозных полостей, продукты гидролиза молока, многообразные гидролизаты (5 % гемогидролизат, 0,5 % гидролизат лактоальбумина) или экстракты тканей. Их химический состав помогает создать условия, какие подобные к тем, что существуют в организме человека. Существенным недостатком таких сред считается их нестандартность, ведь качественный и количественный состав компонентов, которые входят к их составу, может изменяться.

Синтетические питательные среды не имеют этого недостатка, ведь их химический состав стандартен, потому что их получают комбинируя многообразные солевые растворы (витамины, аминокислоты) в искусственных условиях. К таким наиболее употребимым растворам принадлежат среда 199 (культивирование первинно-трипсинизированных и перевиваемых культур клеток), среда Игла (содержит минимальный набор аминокислот и витаминов и используется для культивирования диплоидных линий клеток и перевиваемых), среда Игла MEM (культивирование особенно требовательных линий клеток), раствор Хенкса, что используется для изготовления питательных сред, отмывания клеток и тому подобное

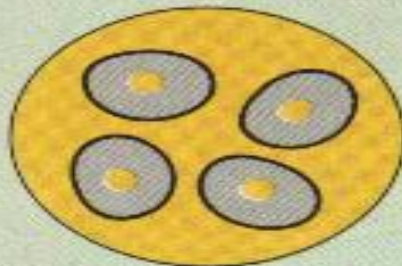
Virus-infected cells



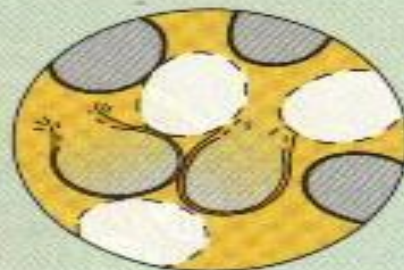
Normal



Inclusion body formation



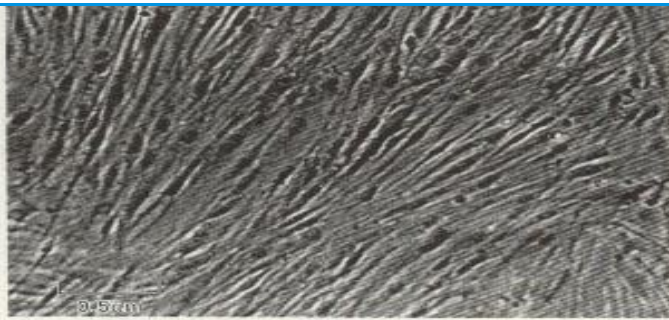
Cell rounding, detachment



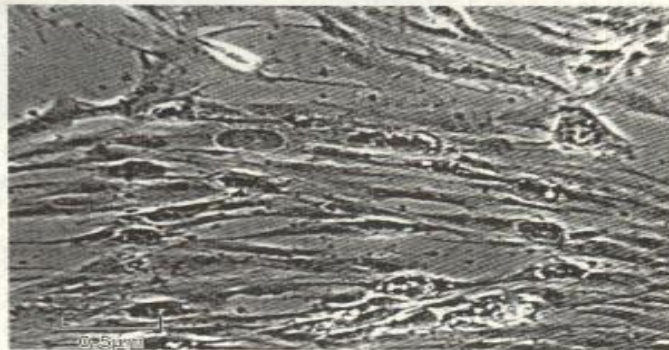
Cell lysis



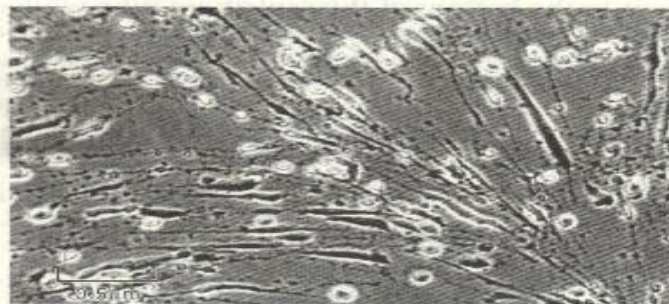
Fused cells



(a)



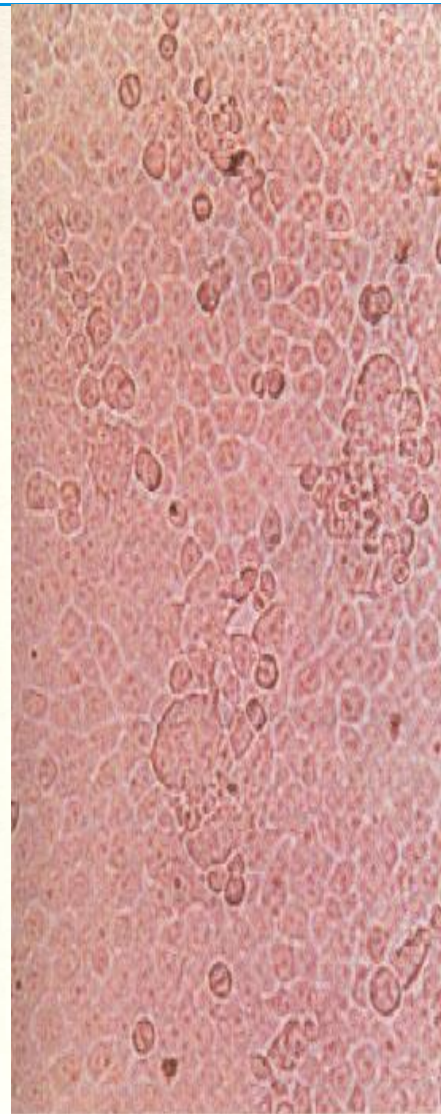
(b)



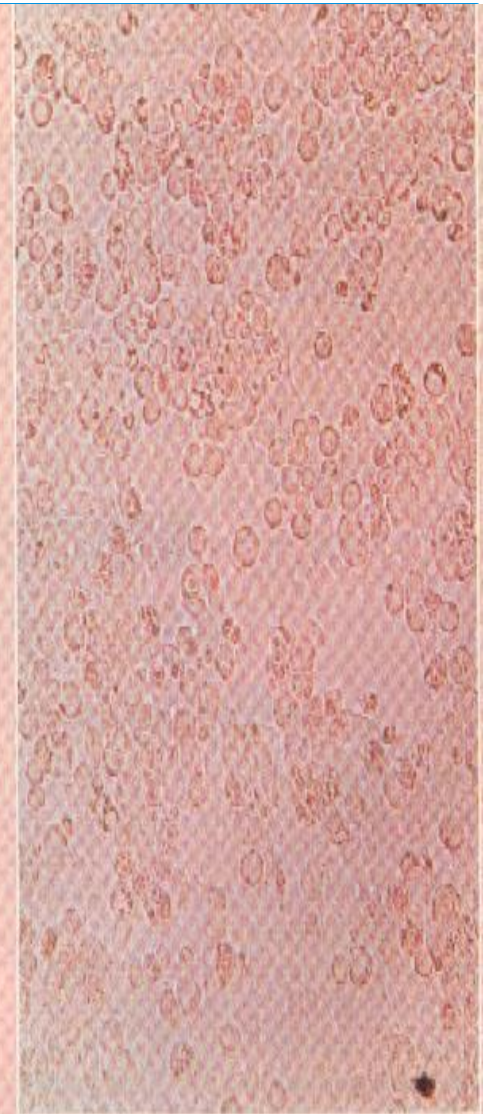
(c)

Figure 13.17

Cytopathic effects of virus infection on tissue culture. (a) Fetal tonsil diploid fibroblasts, uninfected. (b) Same cells infected with adenovirus. (c) Same cells infected with herpes simplex virus. Note that the monolayer is totally destroyed.



B3, Light micrograph showing the cytopathic effect on HEp-2 cells grown in tissue culture by an infection with adenovirus.



B4, Light micrograph showing the cytopathic effect on HEp-2 cells grown in tissue culture by an infection with respiratory syncytial virus.



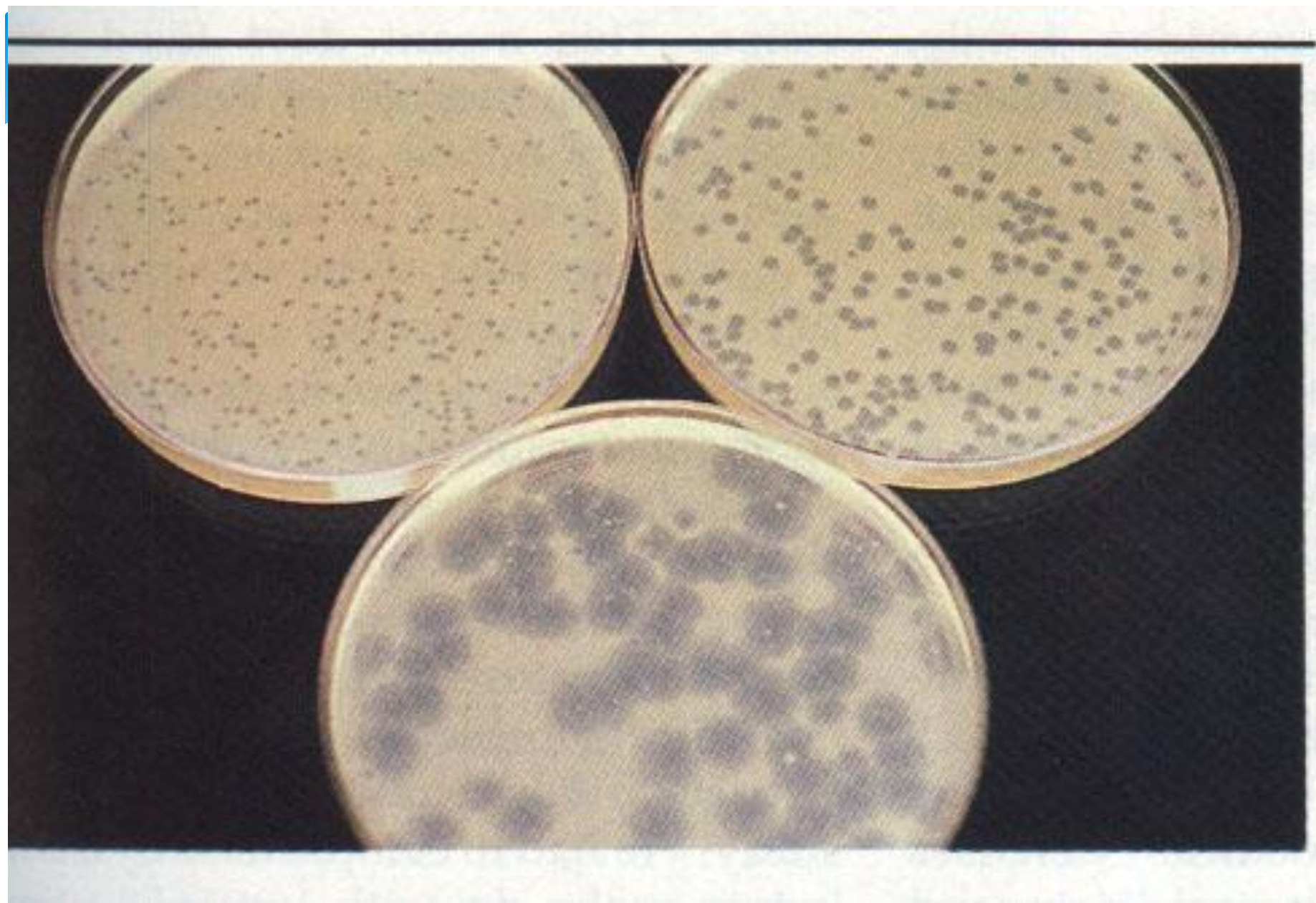
Заражение лабораторных животных.

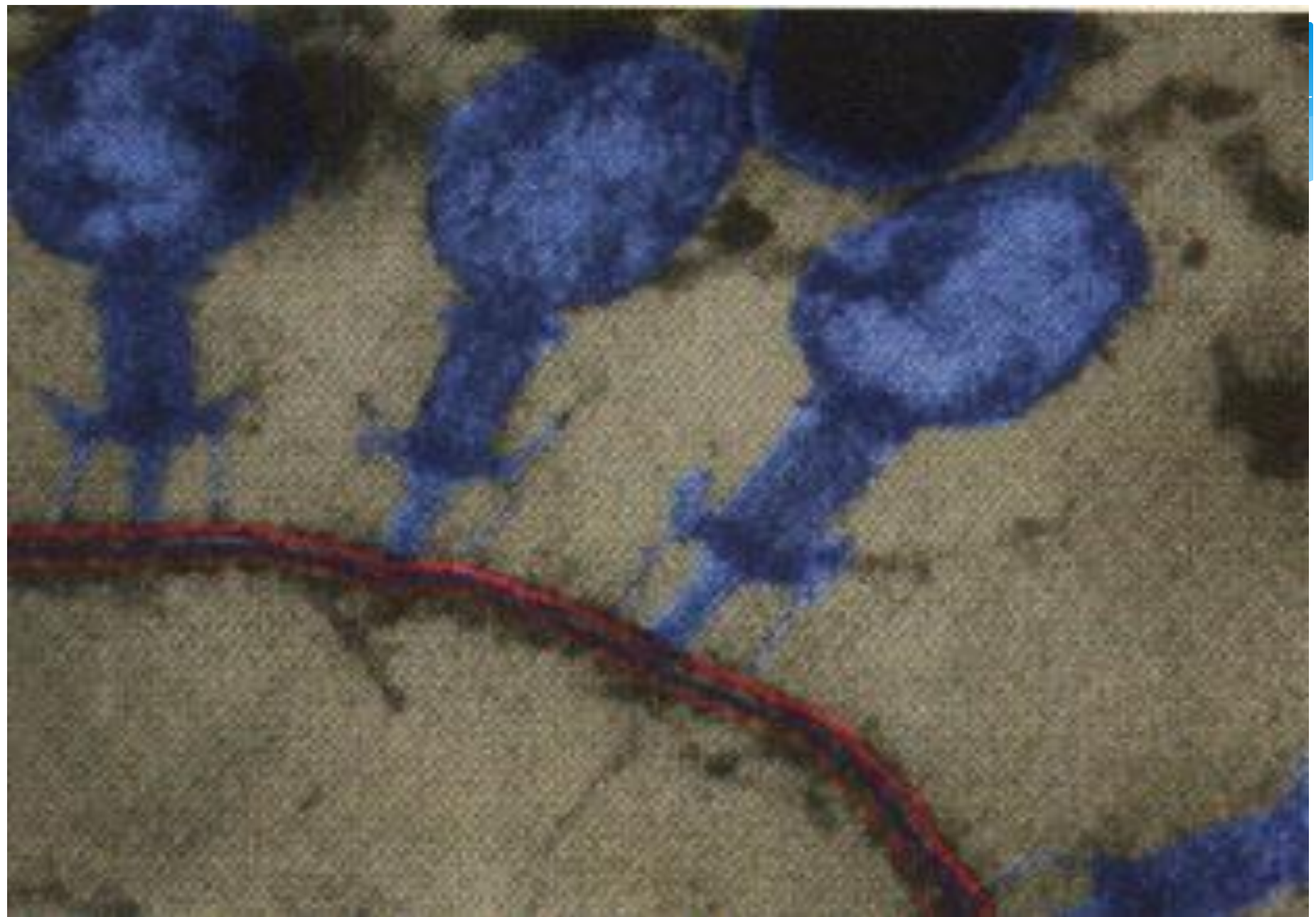
Многочисленные лабораторные животные широко используются в вирусологии для выделения и идентификации вирусов, получения специфических противовирусных сывороток, изучения многообразных аспектов патогенеза вирусных заболеваний, разработки способов борьбы с заболеваниями и их профилактики. Чаще всего используют белых мышей разного возраста (двухдневного возраста), белых крыс, гвинейских свинок, кролей, сусликов, хлопчатниковых крыс, мартышек и других.

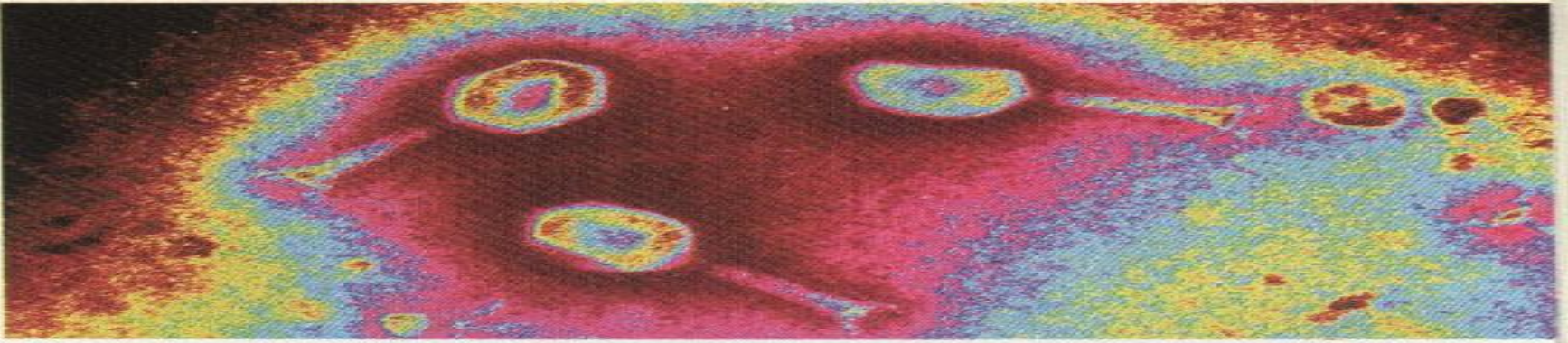
Существуют многообразные способы заражения животных в зависимости от тропизма вирусов, клинической картины заболевания.

Исследуемый материал можно вводить:

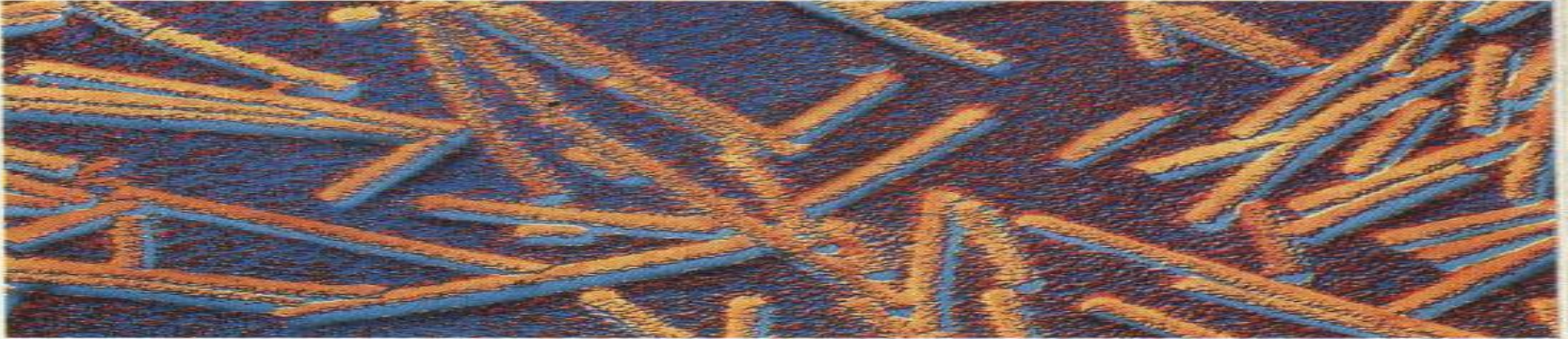
- через рот
- в дыхательные пути (ингаляторно, через нос)
- накожный
- внутрикожно
- подкожно, внутримышечный
- внутривенно
- внутрибрюшинно
- внутрисердечно
- на скарифицированную роговицу
- в переднюю камеру глаза
- в МОЗГ.



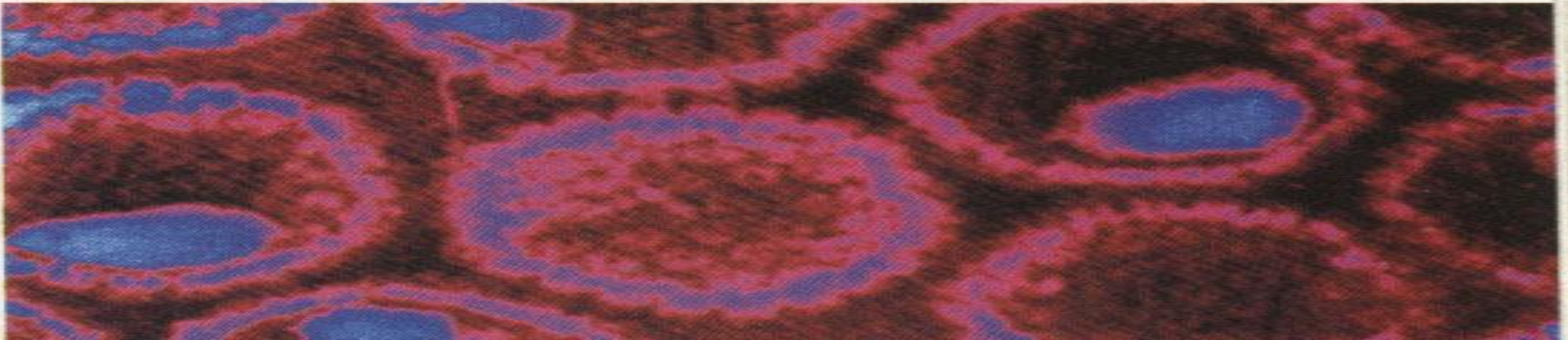




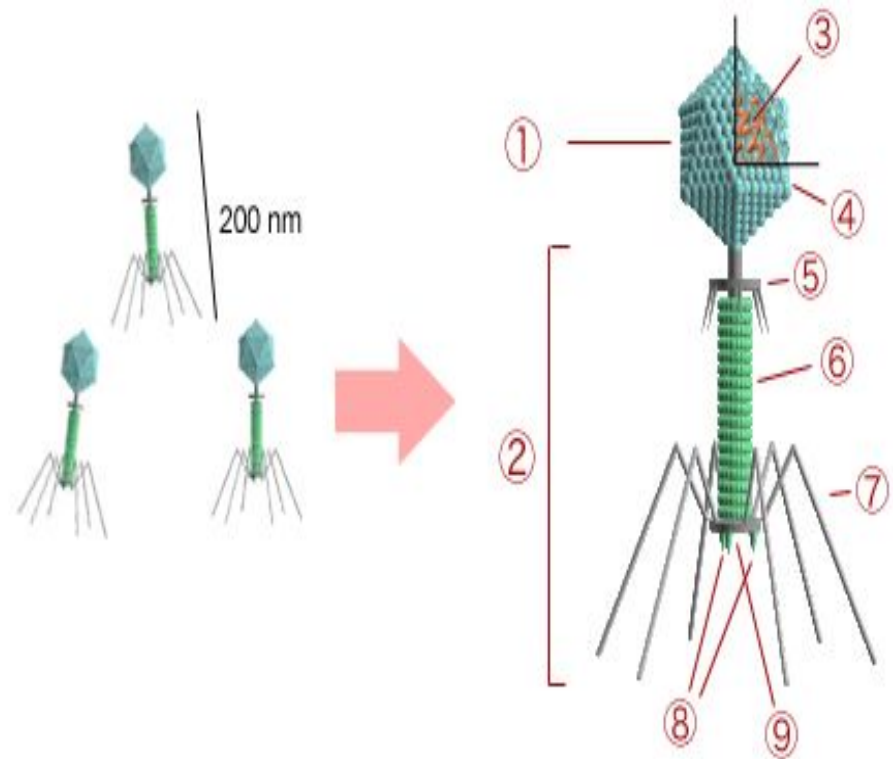
(q)



(a)



Бактериофаги (фаги) (от др.-греч. *φαῖω* — «пожираю») — вирусы) (от др.-греч. *φαῖω* — «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные) (от др.-греч. *φαῖω* — «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис) (от др.-греч. *φαῖω* — «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис. Как правило, бактериофаг состоит из белковой оболочки и генетического материала одноцепочечной или двуцепочечной нуклеиновой кислоты) (от др.-греч. *φαῖω* — «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис. Как правило, бактериофаг состоит из белковой оболочки и генетического материала одноцепочечной или двуцепочечной нуклеиновой кислоты (ДНК) (от др.-греч. *φαῖω* — «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис. Как правило, бактериофаг состоит из белковой оболочки и генетического материала одноцепочечной или двуцепочечной нуклеиновой кислоты (ДНК или, реже, РНК) (от др.-греч. *φαῖω* — «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис. Как правило, бактериофаг состоит из белковой оболочки и генетического материала одноцепочечной или двуцепочечной нуклеиновой кислоты (ДНК или, реже, РНК). Размер частиц приблизительно от 20 до 200 нм) (от др.-греч. *φαῖω* — «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис. Как правило, бактериофаг состоит из белковой оболочки и генетического материала одноцепочечной или двуцепочечной нуклеиновой кислоты (ДНК или, реже, РНК). Размер частиц приблизительно от 20 до 200 нм. Независимо от Фредерика Туорта французско-канадский микробиолог Д'Эрель, Феликс) (от др.-греч. *φαῖω* — «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис. Как правило, бактериофаг состоит из белковой оболочки и генетического материала одноцепочечной или двуцепочечной нуклеиновой кислоты (ДНК или, реже, РНК). Размер частиц приблизительно от 20 до 200 нм. Независимо от Фредерика Туорта французско-канадский микробиолог Д'Эрель, Феликс 3 сентября 1917 год сообщил об открытии бактериофагов.^[1] Наряду с этим известно, что российский микробиолог Николай Фёдорович Гамалея ещё в 1898 году, впервые наблюдал явление лизиса бактерий (сибиреязвенной палочки) под влиянием перевиваемого агента^{[2][3]}.



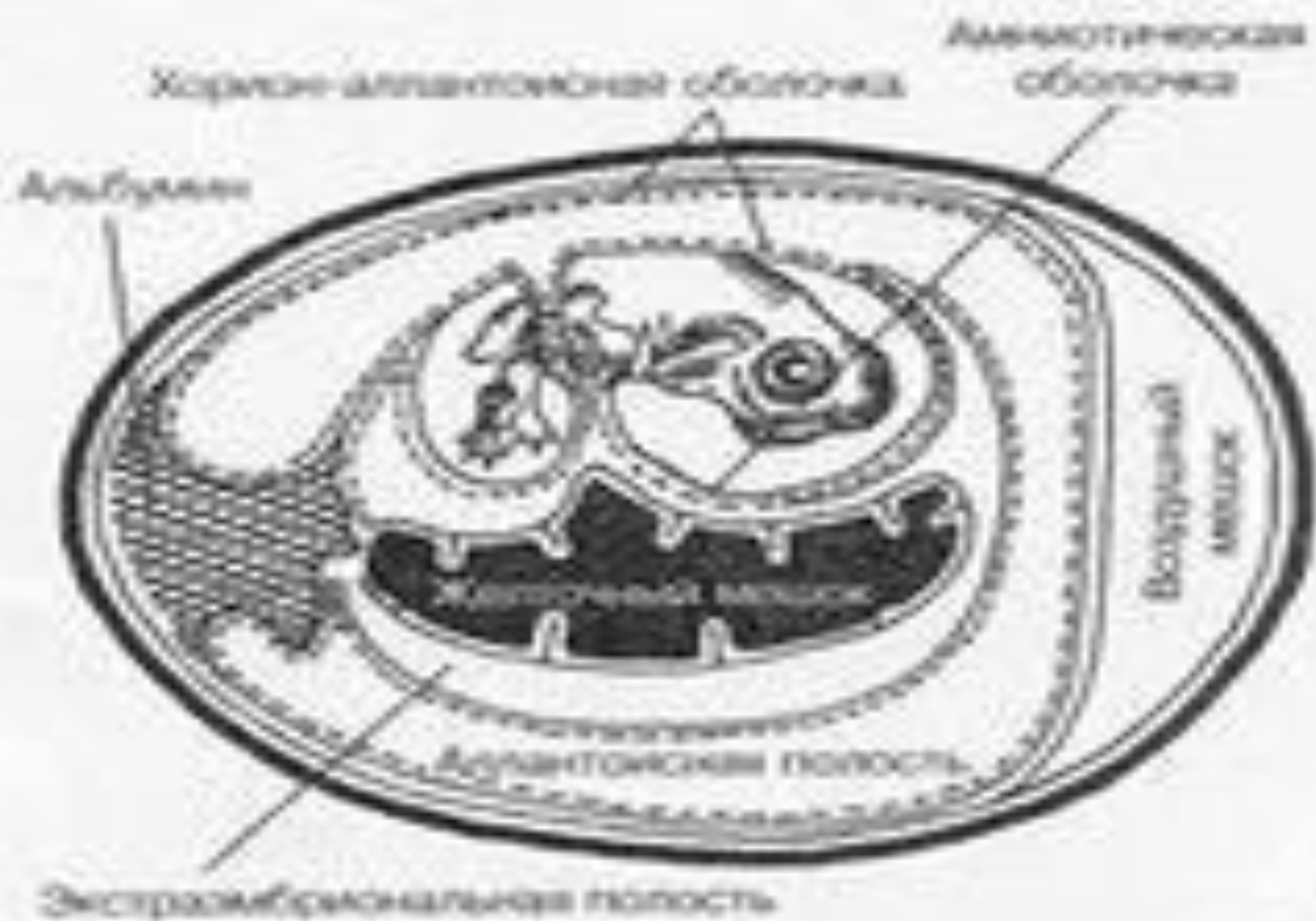
- 1 — головка,
- 2 — хвост,
- 3 — нуклеиновая кислота,
- 4 — капсид,
- 5 — «воротничок»,
- 6 — белковый чехол хвоста,
- 7 — фибрилла хвоста,
- 8 — шипы,
- 9 — базальная пластинка

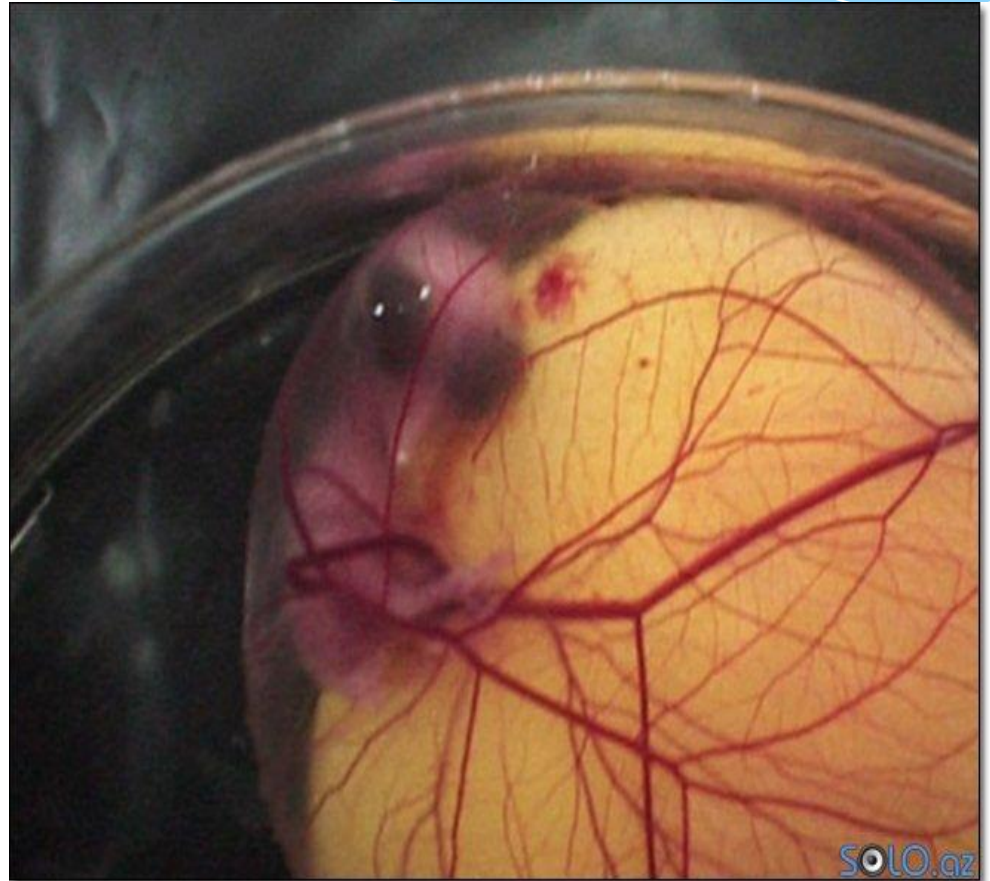
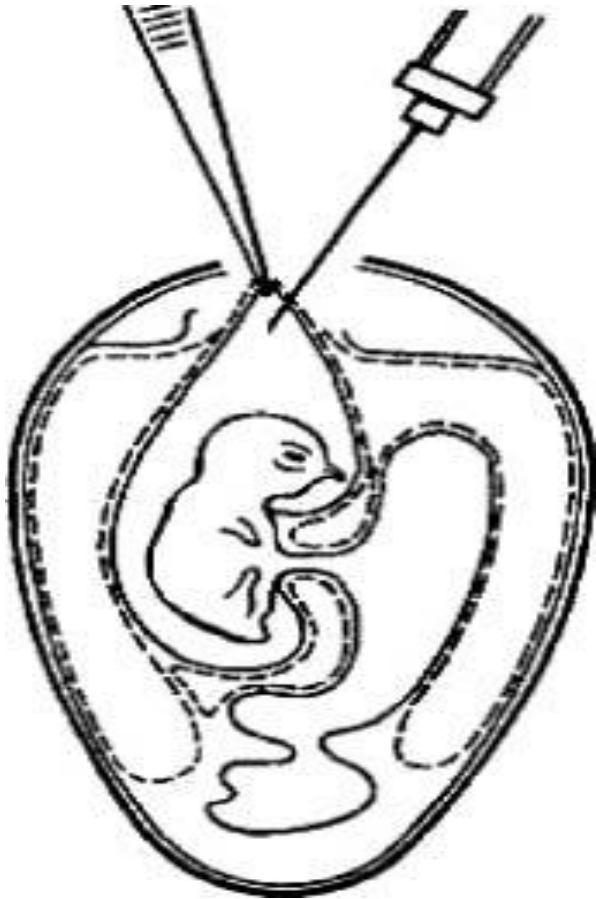
Заражение куриного эмбриона

Куриный эмбрион используется для культивирования вирусов, микоплазм. Используют эмбрионы в возрасте 8-14 дней в зависимости от вида вируса и способа заражения; на хорион-аллантоисную оболочку, в аллантоисную и ам-ниотическую полость, в желточный мешок. Перед-заражением определяют жизнеспособность эмбриона в овоскопе и отмечают карандашом на скорлупе границы воздушного мешка. Заражение куриных эмбрионов производят в боксе в строго асептических условиях, пользуясь инструментом, стерилизованным кипячением. Скорлупу над воздушным пространством протирают спиртом, обжигают в пламени, смазывают 2% раствором йода, снова протирают спиртом и обжигают. Вирусный материал в количестве 0.05 — 0.2 мл наносят на хорион-аллантоисную оболочку туберкулиновым шприцом или пастеровской пипеткой. Вскрытие эмбрионов производят через 48 — 72 часа инкубации в термостате. Наличие вируса в хорион-аллантоисной оболочке определяют:

1. По белесоватым непрозрачным пятнам разной формы;
2. В реакции гемагглютинации.







Микробиологическая диагностика. Вирусологический метод: вирус выделяют из слюны, цереброспинальной жидкости, мочи, заражая культуру клеток или куриный эмбрион. Для идентификации вируса применяют РИФ, РТГА, РСК, ПЦР. Серологический метод: с помощью РСК, РТГА, ИФА определяют 4-х кратное увеличение титра антител в сыворотке крови больного; выявляют IgM-, IgG-антитела.

Специфическая профилактика. Имеются живая паротитная аттенуированная вакцина, ассоциированные вакцины (против кори, паротита, краснухи).

The top of the slide features a solid blue rectangular header. Below this header, there are several overlapping, wavy, light blue shapes that create a sense of depth and movement, resembling stylized waves or layers of paper.

Спасибо!!!