

УДК 616-097./034
Д39

А в т о р:

Дешева Юлия Андреевна — доктор медицинских наук, доцент, вед. н. с. отдела вирусологии ФГБНУ «ИЭМ»; профессор кафедры ФПМиМТ факультета стоматологии и медицинских технологий СПбГУ.

Дешева Ю. А.
Д39 Медицинская вирусология : учебно-методические рекомендации к практическим занятиям / Ю. А. Дешева. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2019. — 85 с. : ил.

ISBN 978-5-299-00992-7

Настоящее учебно-методическое пособие рекомендовано учебно-методической комиссией факультета стоматологии и медицинских технологий Санкт-Петербургского Государственного университета к использованию на практических занятиях для студентов и аспирантов, обучающихся по программе курса медицинской вирусологии, протокол № 5 от 17 января 2017 г. Пособие составлено в соответствии с модульной системой обучения. Вводные указания предназначены для прочтения обучающимися перед началом каждого модуля. Они имеют цель ориентировать обучающихся в общем направлении проводимого практикума, но не заменяют собой учебник.

УДК 616-097./034

СОДЕРЖАНИЕ

Условные сокращения	4
Модуль 1. Общая вирусология. Методы вирусологического исследования	5
Вводные указания к темам практических работ № 1–8, выполняемых на занятиях 1–7.	5
Содержание занятий	23
Модуль 2. Вирусная инфекция и противовирусный иммунитет	33
Вводные указания к темам практических работ № 8–14, выполняемых на занятиях 8–16.	33
Содержание занятий	46
Модуль 3. Молекулярная вирусология	57
Вводные указания к темам практических работ № 16–21, выполняемых на занятиях 17–21.	57
Содержание занятий	75
Глоссарий	81
Приложение	84

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

Аг	— антиген
АЕ	— агглютинирующая единица
БСА	— бычий сывороточный альбумин
ВОЗ	— Всемирная организация здравоохранения
вРНК	— вирусная рибонуклеиновая кислота (РНК)
ИФА	— иммуноферментный анализ
КИД ₅₀	— 50 % культуральная инфекционная доза
МЕ	— международные единицы
мРНК	— матричная РНК
ОП	— оптическая плотность
ОРВИ	— острая респираторная вирусная инфекция
ОТ-ПЦР	— обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция
РГА	— реакция гемагглютинации
РИНА	— реакция ингибирования нейраминидазной активности
РКЭ	— развивающиеся куриные эмбрионы
МН	— реакция микронейтрализации
РТГА	— реакция торможения гемагглютинации
ФБ	— фосфатный буферный раствор
ФБ-Т	— фосфатно-солевой буфер с добавлением Tween-20
ЭИД ₅₀	— 50% эмбриональная инфекционная доза
ДЕРС	— диэтилпирикарбонат
НА	— гемагглютинин
MDCK	— культура клеток Madin-Darby Canine Kidney
NA	— нейраминидаза
RDE	— receptor destroying enzyme — фермент, разрушающий рецепторы
ТМВ	— 3,3',5,5'-тетраметилбензидин
ТРСК	— L-1-Tosylamide-2-Phenylethyl-Chloromethyl Ketone
ВГА	— вирус гепатита А
ВПЧ	— вирус папилломы человека
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	— иммуноферментный анализ
кДНК	— ДНК-копия
ОТ	— обратная транскриптаза
РИФ	— реакция иммунофлюоресценции
РНК	— рибонуклеиновая кислота
РСК	— реакция связывания комплемента
ТОРС	— тяжелый острый респираторный синдром
ФБС	— фетальная бычья сыворотка
ХА	— холодоадаптированный
ХАО	— хориоаллантоисная оболочка
ЦПД	— цитопатическое действие
ЭДТА	— этилендиаминтетраацетат
ЭИД ₅₀	— 50 % эмбриональная инфекционная доза вируса Dulbecco's modified Eagle Medium (модифицированная Далбеко среда Игла)

МОДУЛЬ 1. ОБЩАЯ ВИРУСОЛОГИЯ. МЕТОДЫ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

План практических занятий модуля 1

№ занятия	Номер и наименование темы практической работы
1	1. Устройство вирусологической лаборатории и методы работы в ней. 2. Строение и классификация вирусов
2	3. Методы вирусологического исследования. 4. Культивирование вирусов в куриных эмбрионах
3	5. Реакция гемагглютинации (РГА)
4	6. Возбудитель вируса гриппа и другие респираторные вирусы
5	7. Методы работы с культурой клеток (начало)
6	7. Методы работы с культурой клеток (окончание)
7	8. Культивирование вирусов в культуре клеток MDCK

Вводные указания к темам практических работ № 1—8, выполняемых на занятиях 1—7

Тема 1. Устройство вирусологической лаборатории и методы работы в ней

Медицинская вирусология как новая область инфекционной патологии возникла в конце XIX в., когда стало ясно, что многие распространенные заразные болезни человека, животных и растений вызываются иными возбудителями, чем бактерии и простейшие. Ими оказались вирусы, впервые открытые Д. И. Ивановским (1892) и М. Бейеринком (1896) при изучении этиологического агента мозаичной болезни табака.

В задачи вирусологических лабораторий входят:

- диагностика вирусных инфекций с помощью различных методов исследования;

- углубленное изучение биологических свойств вирусов и процессов их взаимодействия с организмом человека и окружающей средой;
- обнаружение возбудителей вирусных инфекций во внешней среде;
- разработка методов специфической профилактики и лечения вирусных заболеваний;
- производство биологических препаратов, применяемых для диагностических, лечебных и профилактических целей;
- обучение специалистов-вирусологов.

Вирусологическая лаборатория строится по типу бактериологической лаборатории с учетом специфики работы — выращивания клеточных культур, ультрацентрифугирования, хранения вирусов при низких температурах и др. Она оборудуется для проведения диагностической работы (выделение вирусов и серологических реакций), изучения свойств вирусов, их структуры, проведения генетических исследований и т.п.

В соответствии с делением возбудителей на группы по степени биологической опасности лаборатории также делят на категории. По номенклатуре ВОЗ выделяют три категории микробиологических лабораторий: а) базовые (основные, или общего типа), которые в связи с конкретными особенностями работы могут быть оборудованы различными защитными устройствами; б) режимные (изолированные); в) особого режима (максимально изолированные).

Безопасность работ в лабораториях всех категорий обеспечивается благодаря соблюдению распорядка и правил работы в них, выполнению требований к лабораторным помещениям и их оснащению, обеспечению соответствующим оборудованием, медицинским контролем состояния здоровья сотрудников, обучению персонала технике безопасности в данном помещении.

Основные правила работы обучающихся в вирусологической лаборатории:

1. В рабочих помещениях лаборатории следует находиться в халатах и сменной обуви.
2. Нельзя вносить личные вещи без необходимости и класть что-либо на столы, кроме рабочей тетради и настоящих методических рекомендаций. Не следует принимать пищу в рабочих помещениях.
3. Рабочее место необходимо содержать в чистоте и производить уборку стола после каждого занятия.

4. Следует бережно относиться к инвентарю, реактивам и оборудованию учебных помещений.

5. Отработанные препараты, пипетки и т. д. следует не оставлять на столе, а опускать в контейнер с дезинфицирующим раствором.

6. В случае попадания инфекционного материала на руки, одежду, стол и пр. необходимо обработать загрязненный объект дезинфицирующим раствором.

7. По окончании работы тщательно мыть руки.

Тема 2. Строение и классификация вирусов

Вирусы — это инфекционные агенты, представляющие собой неклеточную форму жизни, составляющую царство *Vira*. Термин «вирус» (лат. *virus* — яд), еще во времена античности обозначавший нечто ядовитое или агрессивное, был использован Луи Пастером для названия возбудителя бешенства («фильтрующийся вирус»), и только в начале XX в. термин «вирус» закрепился в современном значении.

Размеры внеклеточных вирусных частиц (в и р и о н о в) широко варьируют. Самые мелкие вирионы имеют размеры от 15 до 40 нм (вирусы ящура, полиомиелита, Коксаки, ЕСНО). Величина вирионов средних размеров находится в пределах 60—80 нм (аденовирусы). Крупные вирионы достигают 180—350 нм (вирус осповакцины).

Вирион состоит из спирально закрученной нуклеиновой кислоты — ДНК или РНК, покрытой снаружи белковой оболочкой (к а п с и д о м). Капсид состоит из отдельных субъединиц — к а п с о м е р о в, идентичных друг другу. Количество капсомеров и способ их укладки строго постоянны для каждого вида вируса. Например, вирус полиомиелита содержит 32 капсомера, а аденовирус — 252. Структурные компоненты вирионов могут быть подразделены на обязательные (оболочка, нуклеиновая кислота) и необязательные (ферменты, включения). Содержание нуклеиновой кислоты и белка у разных вирусов разное. Так, у вируса гриппа на долю нуклеиновой кислоты приходится 1 %, у вируса полиомиелита — 25 %, у бактериофагов — 50—60 % массы белка. У сложных вирусов в дополнение к капсиду имеется внешняя оболочка, состоящая из белков и липидов. В зависимости от наличия/отсутствия внешней оболочки (суперкапсида) выделяют две основные группы вирусов — безоболочечные и оболочечные, которые различаются меха-

низмом проникновения в клетку, а также способом выхода из нее потомства вирионов.

К уникальным свойствам вирусов относится способ их размножения, который резко отличается от способов размножения всех других клеток и организмов (бинарное деление, почкование, образование спор). Вирусы не растут, и их размножение обозначается как дизъюнктивная (разобшенная) репродукция, что подчеркивает разобщенность в пространстве (на территории клетки) и времени синтеза вирусных компонентов (нуклеиновых кислот и белков), с последующей сборкой и формированием вирионов.

Репродукция вирусов состоит из репликации вирусного генома с образованием многочисленных копий родительской ДНК или РНК и индуцированного ими синтеза вирусных белков. Из вновь синтезированных вирусных компонентов путем самосборки формируются вирионы. В основе самосборки вирусных частиц лежит процесс, связанный с уменьшением свободной энергии системы, поскольку упорядоченный капсид обладает меньшей свободной энергией, чем отдельные пептидные субъединицы.

Классификация вирусов. Международным комитетом по таксономии вирусов в 1966 г. была принята система классификации вирусов, основанная на различии типа (РНК и ДНК), количества молекул нуклеиновых кислот (одно- и двухцепочечные) и на наличии/отсутствии оболочки. Система классификации представляет собой серию иерархических таксонов: отряд (*-virales*); семейство (*-viridae*); подсемейство (*-virinae*); род (*-virus*); вид (*-virus*).

Нобелевский лауреат биолог Дэвид Балтимор предложил свою схему классификации вирусов, основываясь на различиях в механизме продукции мРНК (рис. 1.1). Эта система включает в себя семь основных групп вирусов:

- (I) содержащие двухцепочечную ДНК и не имеющие РНК-стадии (например, герпесвирусы, поксвирусы, паповавирусы, мимивирус);
- (II) содержащие двухцепочечную РНК (например, ротавирусы);
- (III) содержащие одноцепочечную молекулу ДНК (например, парвовирусы);
- (IV) содержащие одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности (например, пикорнавирусы, флавивирусы);
- (V) содержащие одноцепочечную молекулу РНК негативной или двойной полярности (например, ортомиксовирусы, филловирусы);

Юлия Андреевна Дешева

МЕДИЦИНСКАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

*Учебно-методические рекомендации
к практическим занятиям*

Редактор *Киреева Л. Ю.*

Корректор *Минин С. П.*

Дизайн и компьютерная верстка *Илюхиной И. Ю.*

Подписано в печать 18.03.2019. Формат 60 × 88 ¹/₁₆.

Печ. л. 5,5. Тираж 500 экз. Заказ №

ООО «Издательство „СпецЛит“».

190103, Санкт-Петербург, 10-я Красноармейская ул., 15,

тел./факс: (812) 495-36-09, 495-36-12,

<http://www.speclit.spb.ru>

Отпечатано в типографии «L-PRINT».

192007, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 201, лит А, пом. 3Н