Virología Guía de conceptos básicos para su estudio

MICROBIOLOGÍA GENERAL



BIBLIOGRAFÍA

Tortora G., Funke B., Case C. Introducción a la microbiología;

Zaragoza: Acribia, 1993. **3° Ed**. Código de Biblioteca: 576.8/T714/.

Capítulo 12: Virus (pág. 318)

Ed. 9 Bs. As. Ed. Médica Panamericana, 2007 : Capítulo 13: Virus, viroides y priones (pág. 386)

Equivalentes en ediciones más recientes (Ed. 12, 2017, pág. 358)

Madigan M., Martinko J., Parker J. Brock, Biología de los microorganismos, desde 8ª ed. Código Biblioteca: 579 MAD BRO 8A 1998. Cap. 8: Virus (pág. 248)

12°Ed. (2009): Cap. 10: Una visión rápida de los virus y la virología. (pág.274) + Cap. 19 (Diversidad viral: pág. 607)

Ed. 14 (2015) 2 capítulos 8 y 9 (desde 257 a 305)

TEMARIO

- Características generales de los virus
- Estructura
- Taxonomía
- Aislamiento, cultivo e identificación. Recuento.
- Multiplicación (replicación) viral: ciclo lítico y lisógenico. Estrategias de sintesís de AN
- Virus y cáncer. Infecciones latentes y persistentes
- Entidades subvíricas: Priones y viroides
- Implicancias prácticas de los virus

Organismos celulares

Procariotas

Eucariotas

Bacterias Arqueas Protistas Plantas Hongos Animales















Organismos no celulares

Virus, Viroides y Priones

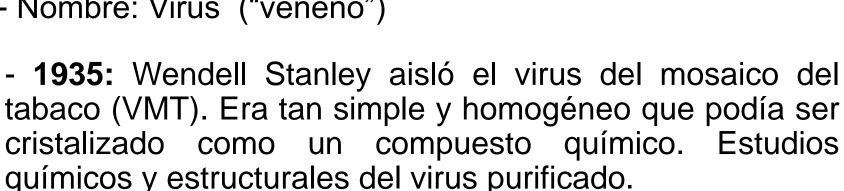






Algo de historia...

- 1892: Dimitri Iwanowski filtró savia de plantas de tabaco enfermas, pero el agente infeccioso no quedó retenido
- Nombre: Virus ("veneno")



- 1940: con el desarrollo del M.E. se estudió en detalle la estructura de los virus.



¿Qué son los virus?

- Agentes infecciosos
- Pequeño tamaño
- Parasitismo obligatorio

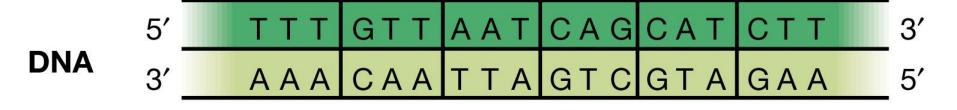
Estructura simple + Replicación viral

- 1 sólo un tipo de AN en el virión: DNA o RNA.
- Cubierta proteica que rodea AN.
- Se multiplican dentro de células vivas.
- Inducen la síntesis de estructuras especializadas capaces de transferir el AN viral a otras células.

"Dogma" central de la biología molecular (Crick 1970)



REPLICACIÓN





TRANSCRIPCIÓN

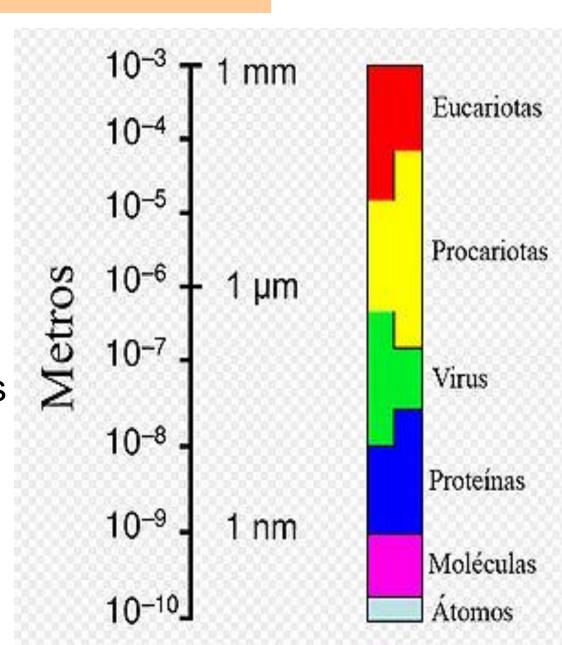
RNA 5' UUU GUU AAU CAG CAU CUU 3'

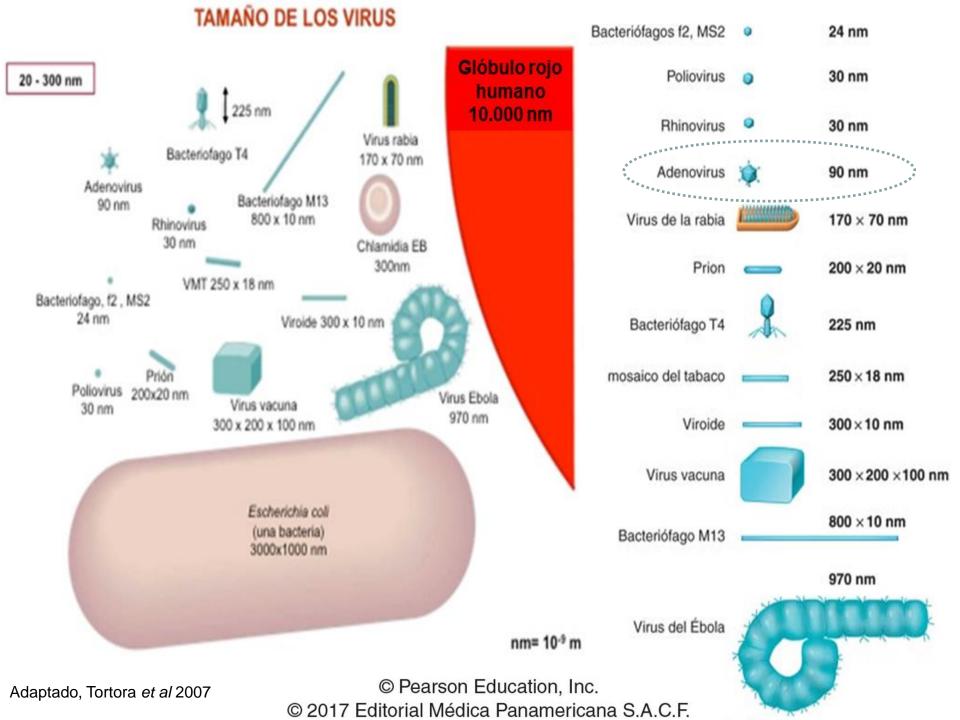


Protein H₂N- Phe Val Asn Gln His Leu -COOH

TAMAÑO

- 20 a 1000 nm
- Ultracentrifugación Microscopía electrónica.
- Más pequeños que bacterias (ultramicroscópicos), aunque algunos virus grandes (virus vaccinia),pueden observarse al microscopio óptico.





Rango de hospedadores

El rango de hospedadores de un virus es el tipo de células que puede infectar

Se pueden dividir en tres grandes clases

virus animales

Infectan insectos y animales de sangre caliente

virus vegetales

Virus del mosaico del tabaco, importantes en agricultura

virus bacterianos

Bacteriófagos o fagos, muy estudiados como sistemas modelo

Especificidad

- Fijación a célula huésped: superficie externa viral + superficie celular (SRES) (pared, fimbrias, flagelos///membrana plasmática)
- b) Disponibilidad, dentro del huésped, de factores necesarios para la replicación viral

VIRIÓN

Partícula infecciosa completa compuesta por ácido nucleico (DNA o RNA, cadena simple o doble), rodeado por una cubierta proteica o cápside, formada por subunidades estructurales.

Tienen un estado

Extracelular

El virión es metabólicamente inerte, sirve para transportar el genoma vírico de la célula que lo produjo a otra



Intracelular

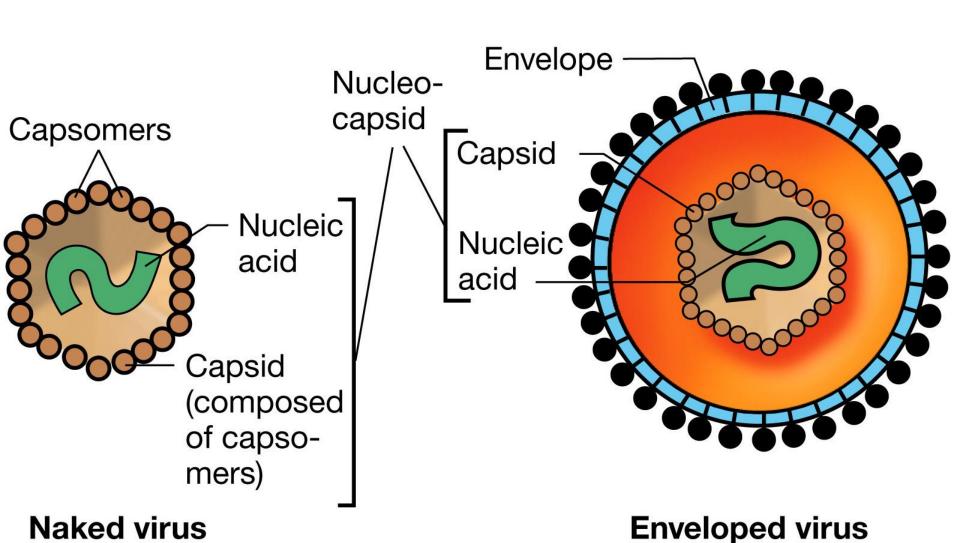
Dentro del huésped, donde ocurre la replicación vírica. Este proceso es la infección

ÁCIDO NUCLEICO (AN)

SSDNA dsDNA SSRNA dsRNA
Parvovirus HPV TMV Rotavirus
M13 T4 MS2 F6

- **DNA**: MONOCATENARIO BICATENARIO LINEAL o CIRCULAR.
- RNA: MONOCATENARIO o BICATENARIO LINEAL (uno o varios segmentos separados, como virus de la gripe)
 - Material genético/proteína: 1(gripe) 50% (fagos)
 - Hasta 250.000 nucleótidos (E. coli: 4 millones).
 - Ej. Sars Cov2: 30.000 nucleótidos
 - Genes PCR

CÁPSIDE Y ENVOLTURA



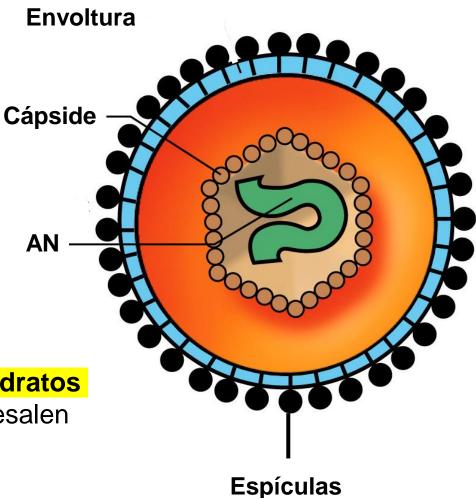
CÁPSIDE Y ENVOLTURA

Cápside: cubierta proteica que protege al AN del virus

Capsómero: unidades proteicas que forman la cápside

Envoltura: combinación de lípidos, proteínas e hidratos de carbono que recubre a la cápside

Espículas: son complejos de hidratos de carbono-proteína que sobresalen de la superficie de la envoltura

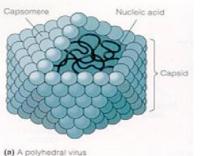


MORFOLOGÍA GENERAL

•Virus helicoidales: bastones (rígidos o flexibles). AN dentro de cápside cilíndrica

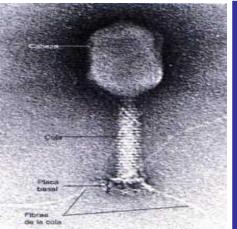
hueca de estructura helicoidal (virus del mosaico del tabaco)

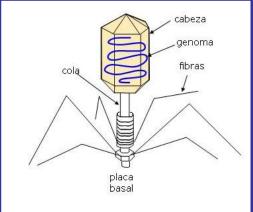
•Virus poliédricos: cápside icosaédrica (20 caras triangulares). (poliovirus, hepatitis A, papiloma, adenovirus)





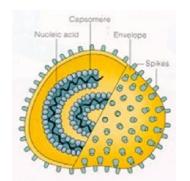
 Virus Complejos: no pertenecen a las categorías señaladas.
 (bacteriófagos T-simétrico)





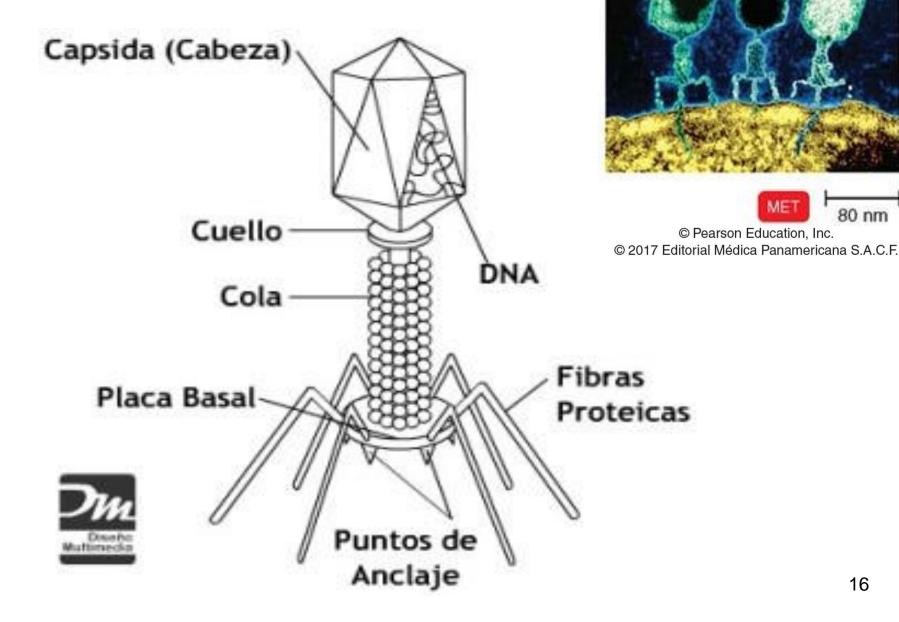
Virus con envolturas: casi esféricos.
 <u>Helicoidales con envoltura</u> (gripe, rabia, ébola, sarampión)

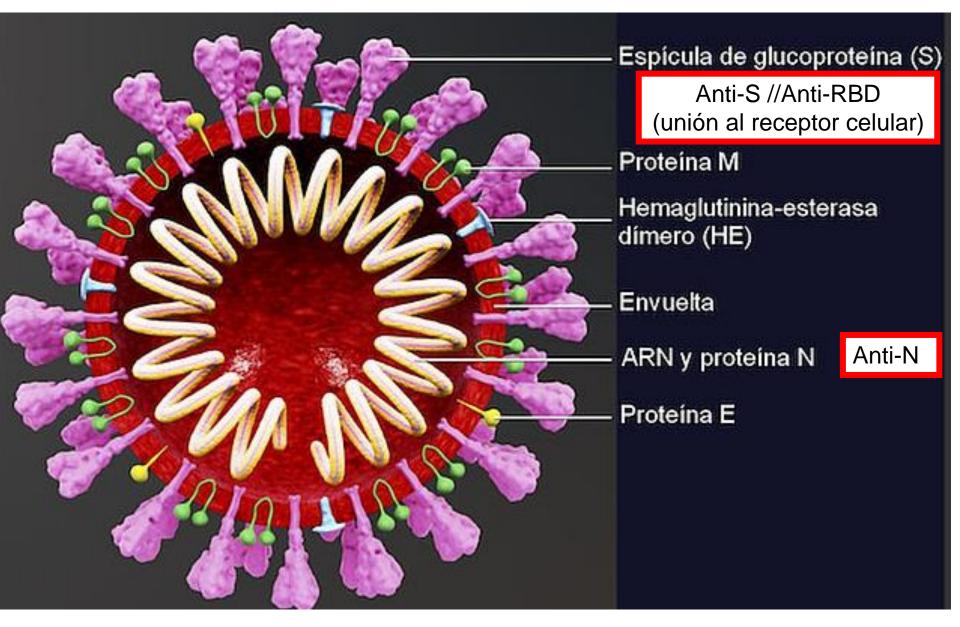
<u>Poliédricos con envoltura</u> (herpesvirus, malaria, dengue, HIV).





Bacteriófago T- par





Taxonomía de virus

Rango de hospedadores – Órganos afectados

1966: Internacional Committee on Taxonomy of Virus (ICTV)

Agrupa los virus en **familias** sobre la base de:

- 1) El tipo de ácido nucleico
- 2) La estrategia de replicación
- 3) La morfología

Familia Herpesviridae, género Simplexvirus, herpesvirus humano 2

Especie viral: grupo de virus que comparten la misma información genética y nicho ecológico (rango de hospedadores).

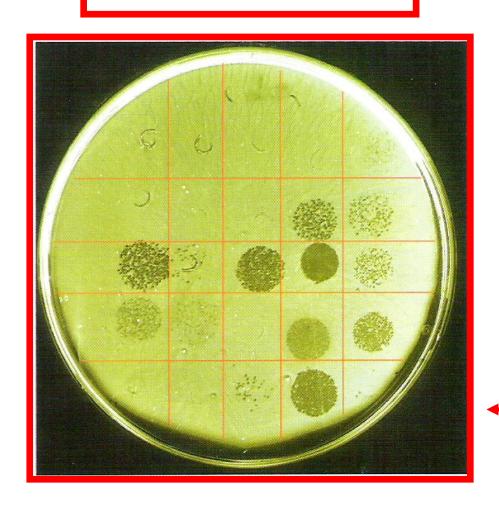
Se designan con nombres descriptivos comunes, y si hay subespecies se designan con número

Virus de la InmunodeficienciaHumana (HIV) — HIV-1

Aislamiento, cultivo e identificación de virus

Bacteriófagos

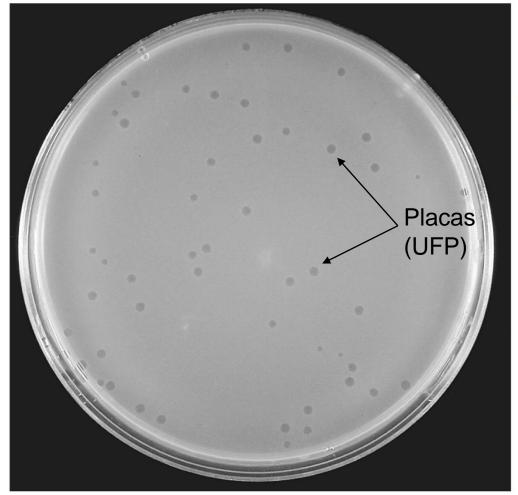
FAGOTIPIFICACIÓN

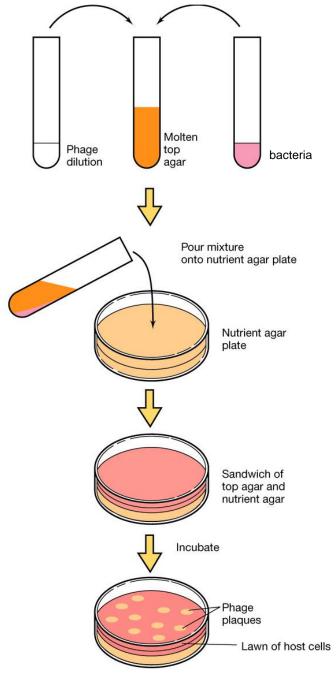


- Placa con medio de cultivo
- Siembra masiva de bacteria
- Inoculación de un fago diferente en cada cuadro de la cuadrícula
- Incubación a tiempo y temperatura óptimos de la bacteria
- -Observación de zonas transparentes en las que no se visualice desarrollo masivo bacteriano

Aislamiento, cultivo e identificación de virus - Recuento

Bacteriófagos





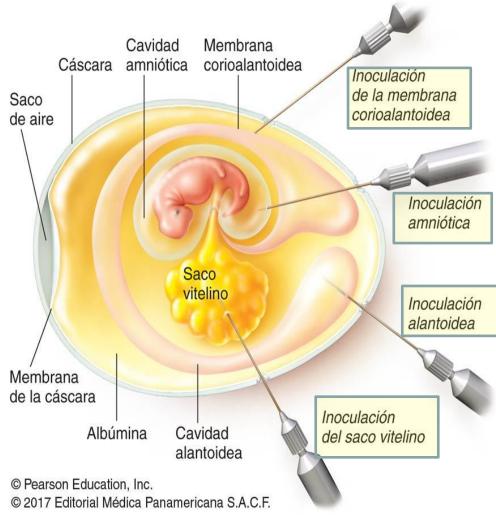
Aislamiento, cultivo e identificación de virus

Virus animales

En animales vivos:

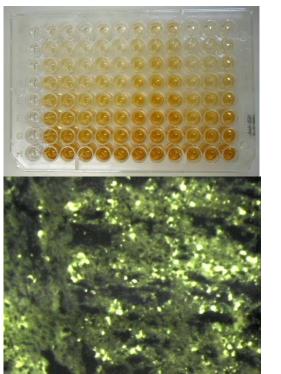
multiplicación; respuesta inmune; diagnóstico por sintomatología

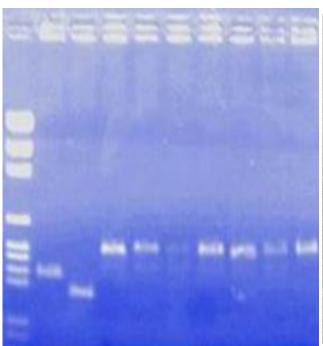
- En huevos embrionados:
 Daño de embrión o membrana
 Vacunas
- En cultivos celulares
- Virus vegetales
- En protoplastos (células vegetales sin pared)
- En células de insectos

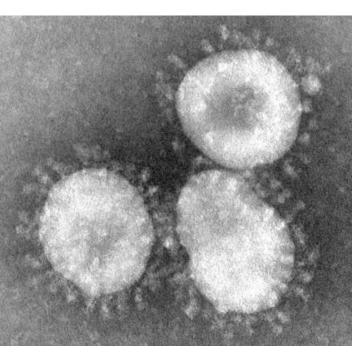


Identificación viral

- MÉTODOS SEROLÓGICOS (proteínas virales): ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), Western blot, inmunofluorescencia
- MÉTODOS MOLECULARES (AN): Hibridación in situ,
 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)
- MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA: partícula viral



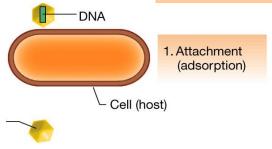




Multiplicación vírica

- Adsorción a la célula hospedadora
- Penetración
- Biosíntesis de los componentes víricos
- Maduración
- Liberación

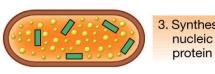
Etapas de la multiplicación vírica



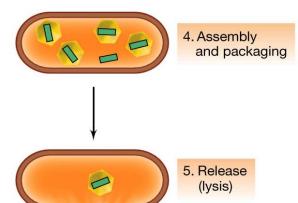
1. Fijación-Adsorción: asociación de sitios específicos del virión (ligandos) con los receptores de superficie de una célula susceptible



2. Penetración: liberación del AN en la célula hospedadora (o la partícula viral completa en virus animales)



3. Synthesis of nucleic acid and



Mature

virus particles

- 3. Biosíntesis de los componentes víricos
- **3a. Fases tempranas de replicación:** se forman enzimas víricas específicas
- 3b. Replicación: del ácido nucleico vírico
- 3c. Síntesis de las subunidades estructurales de la cápside
- **Ensamblaje** de las unidades estructurales empaquetamiento del ácido nucleico en nuevas partículas víricas ("maduración")
- 5. Liberación de los viriones maduros fuera de la célula

Curva de la multiplicación viral

calvas

Recuento relativo de virus

unidade

- Adsorción
- Eclipse
- Maduración

(LATENCIA)

Liberación

Tamaño de explosión

Duración del ciclo

- V.B.: 20 - 60 minutos

- V.A.: 8 - 40 horas

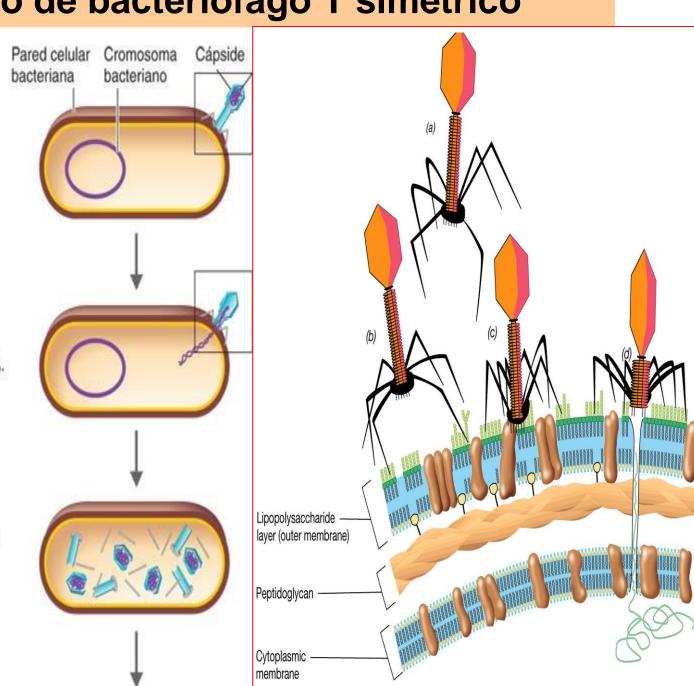
Eclipse Maduración Ácido Cubierta de **Enzimas** nucleico proteínas tempranas formadora Adición Ensamblado de virus y liberación Período de latencia

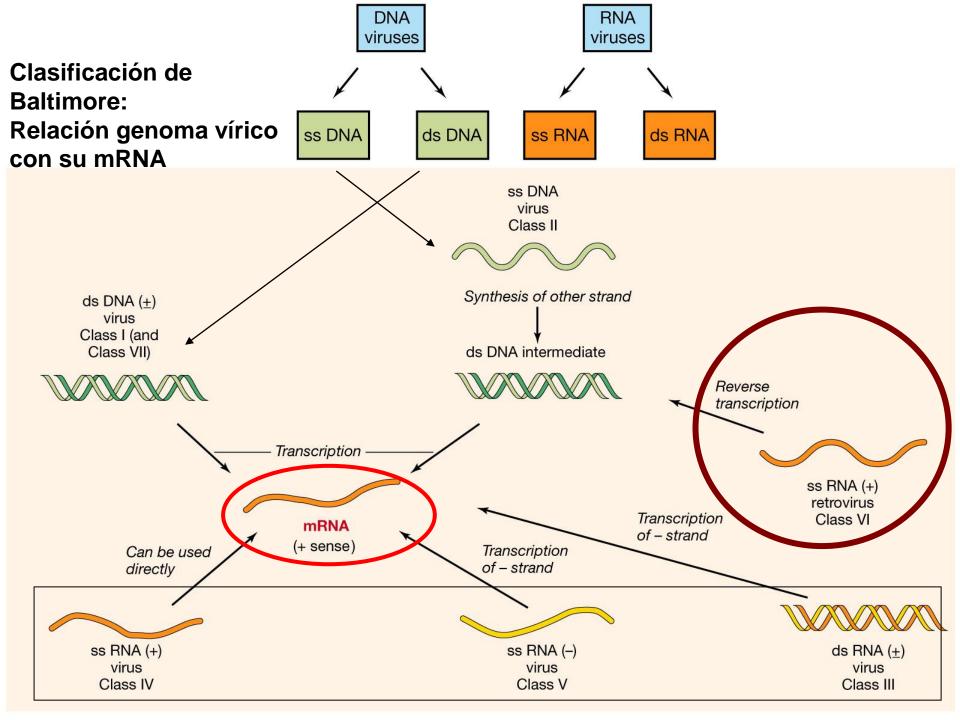
Ciclo lítico de bacteriófago T simétrico

Fijación: el fago se une a la célula huésped.

Penetración: el fago penetra en la célula huésped e inyecta su DNA.

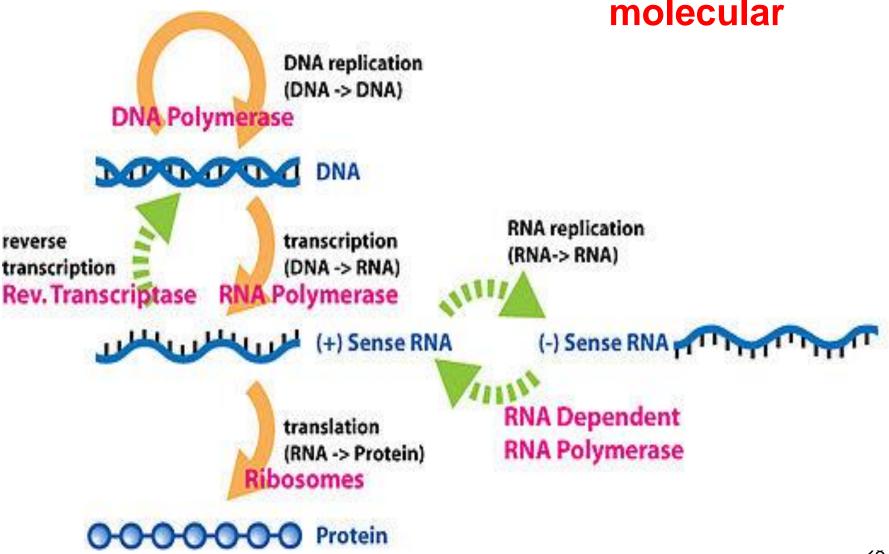
Biosíntesis: el DNA del fago dirige la síntesis de los componentes virales por la célula huésped.

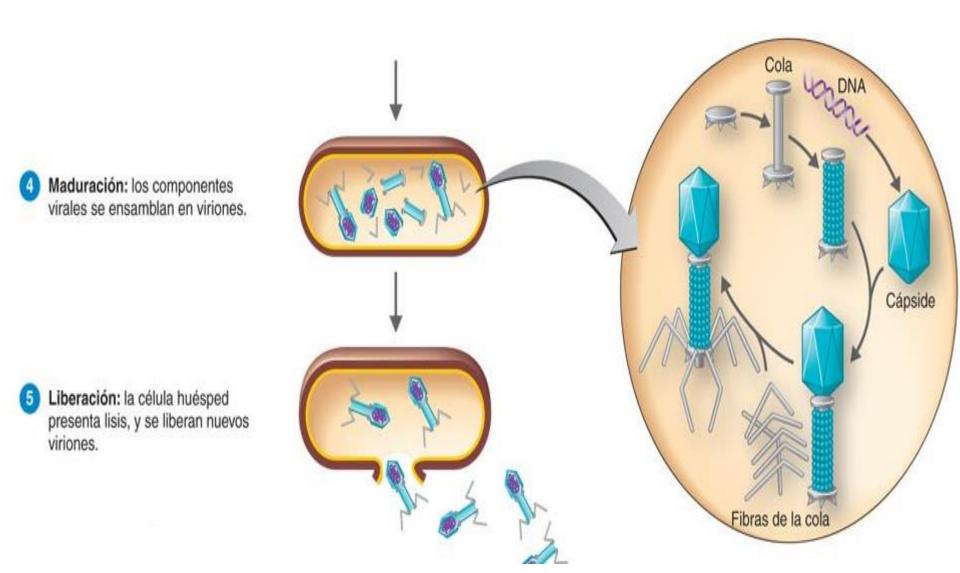




EXCEPCIONES al ...

Dogma central de la biología molecular

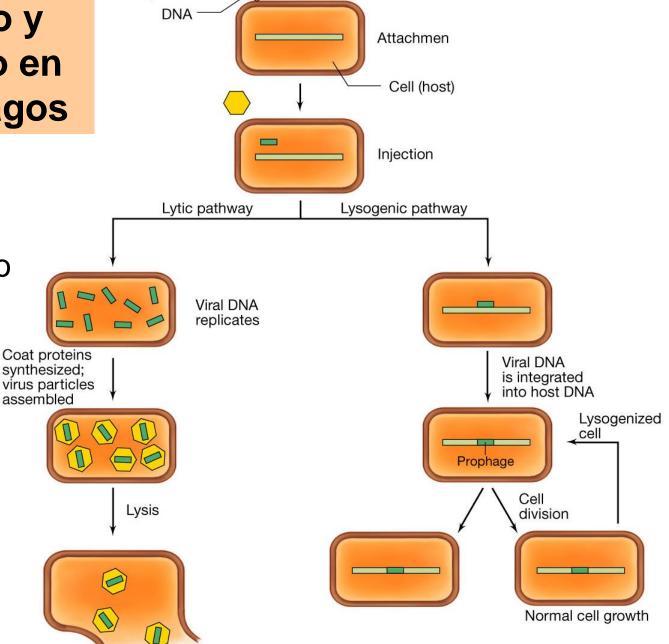




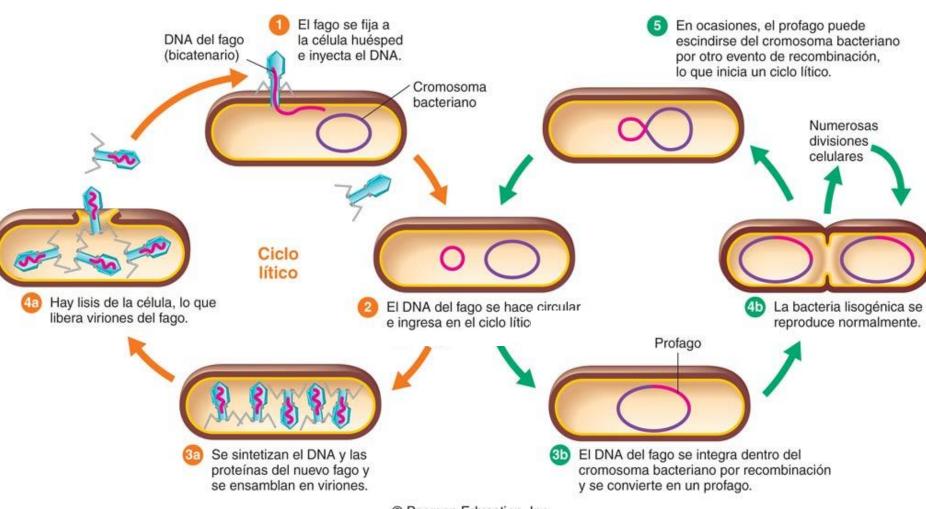
Ciclo lítico y lisogénico en bacteriófagos

Virus particle

Ciclo lisógenico: Bacteriófago Lambda (λ)



Ciclo lisógenico: Bacteriófago Lambda (λ)

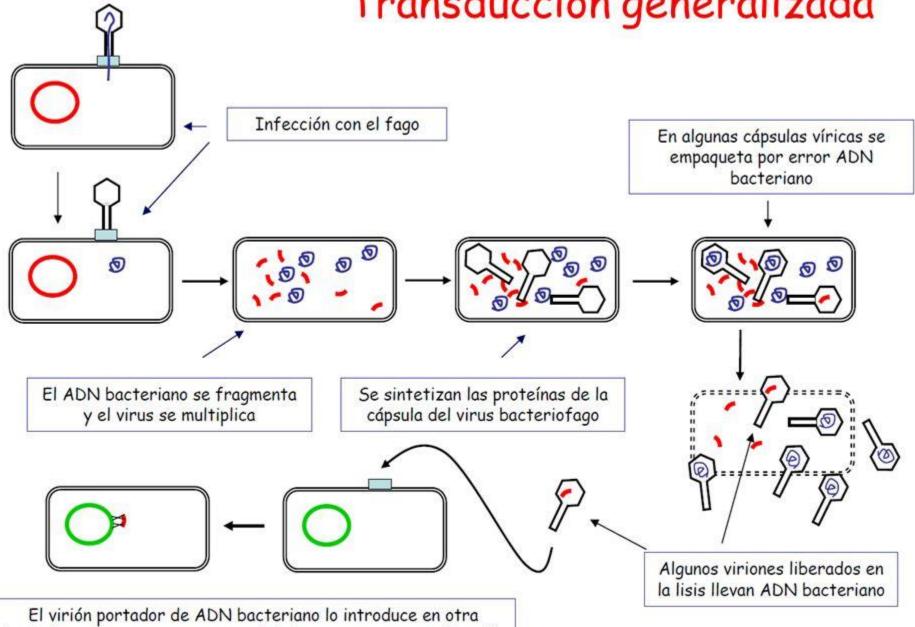


© Pearson Education, Inc.
© 2017 Editorial Médica Panamericana S.A.C.F.

Ciclo lisogénico

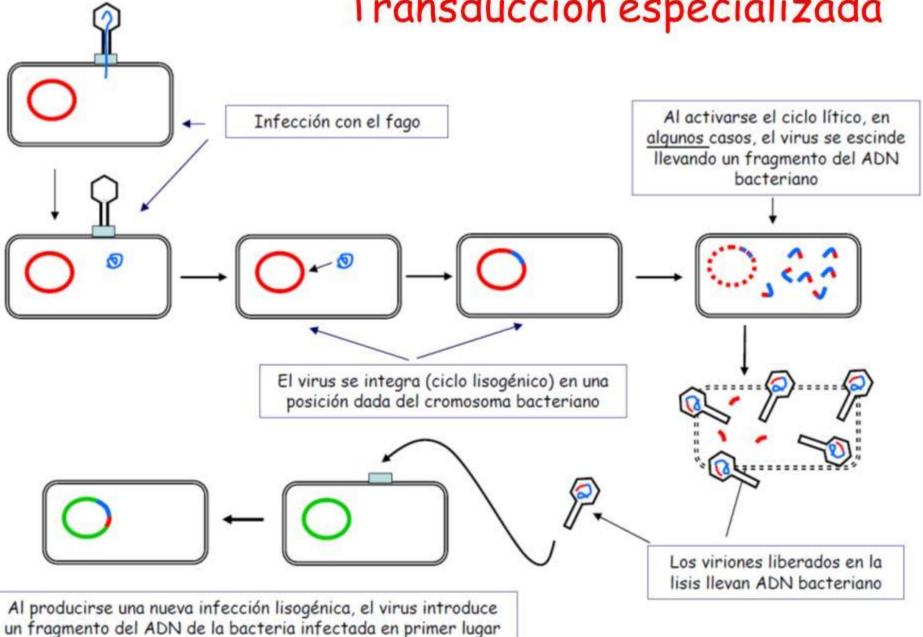
- El ácido nucleico viral no expresa sus genes, se integra en el genoma de la célula o queda libre a modo de plásmido.
- El virus queda en forma de provirus (latente, inactivo). Las células huéspedes bacterianas participantes se denominan células lisogénicas
- La célula lisogénica se hace inmune a la re-infección por el mismo fago. Además, puede exhibir nuevas propiedades.
- Por distintos factores el provirus puede comenzar un ciclo normal o lítico.
- Posibilita el fenómeno de transducción especializada: el DNA pasa dentro de un bacteriófago desde la célula donadora a la receptora (fago transductor: fago defectuoso que lleva información bacteriana)

Transducción generalizada



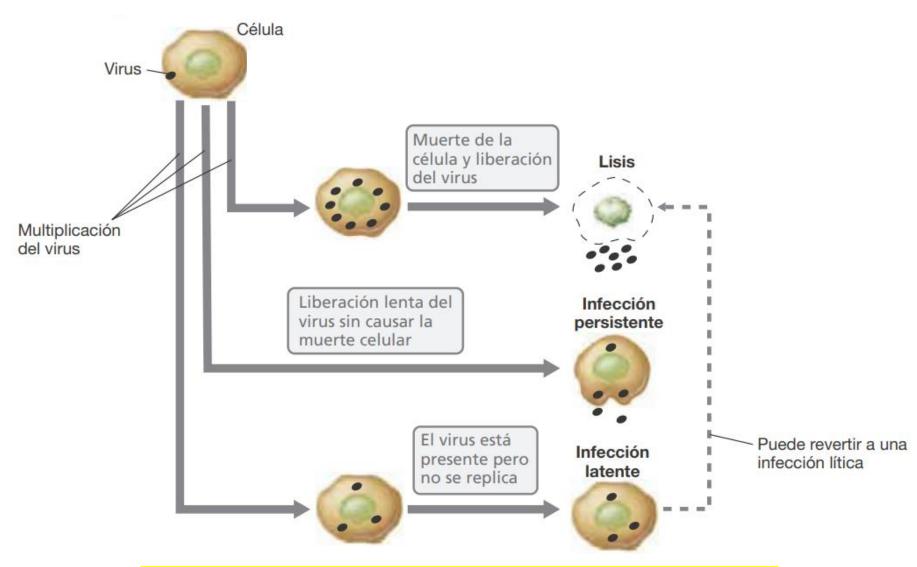
bacteria en cuyo cromosoma puede integrarse por recombinación

Transducción especializada



Comparación multiplicación Bacteriófagos *vs.* Virus animales

Etapas	Bacteriófagos	Virus animales
Fijación ↓	Proteínas de pared celular (flagelos)	
Entrada	DNA viral inyectado en bacteria huésped	
Eliminación de cubierta	No es necesaria	
Biosíntes	sis Citoplasma	
Infección crónica	Lisogenia	
Liberació	huésped	



Virus de animales: posibles efectos en las células que infectan Mayoría de los virus de animales son líticos

Virus animales e infecciones crónicas VIRUS Y CÁNCER

La causa viral del cáncer a menudo pasa inadvertida por:

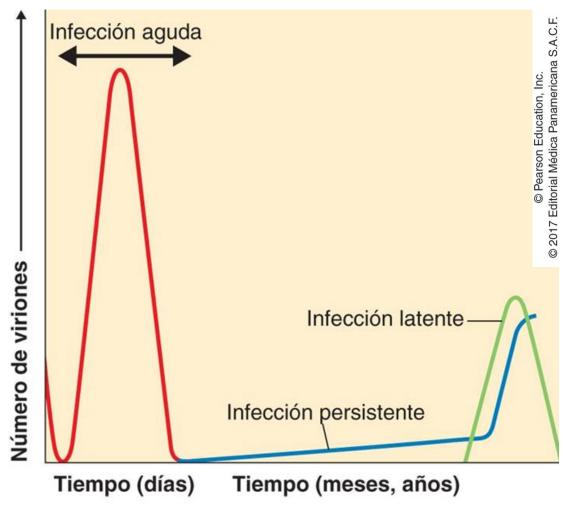
- La mayoría de los virus infectan las células pero no inducen cáncer
- El cáncer puede no desarrollarse hasta mucho después de la infección viral
- Los cánceres no parecen ser contagiosos, como las enfermedades virales
- VIRUS ONCOGÉNICOS: inducen formación de tumores en animales
- El material genético viral se integra al DNA de la célula huésped y se replican en forma conjunta > transformación celular
- Virus de DNA oncogénicos: HPV virus de Epstein-Bar virus de hepatitis B
- Virus de RNA oncogénicos: retrovirus
- VIRUS ONCOLÍTICOS

Virus animales e infecciones crónicas Infecciones latentes e infecciones persistentes

Infección
latente:
durante años.
herpesvirus
humanos,
herpes zoster
(relacionado
con varicela).



Infección viral persistente o crónica: ocurre en forma gradual durante un período prolongado. En general son fatales y suelen ser causadas por virus convencionales.



Virus animales e infecciones crónicas Infecciones latentes e infecciones persistentes

Enfermedad	Efecto primario	Virus causal
Latente	Sin síntomas durante la latencia; en general, no se liberan virus	
Aftas	Lesiones cutáneas y mucosas; lesiones genitales	Herpes simple 1 y 2
Leucemia	Mayor crecimiento de leucocitos sanguíneos	HTLV-1 y 2
Herpes zóster	Lesiones cutáneas	Varicellovirus (herpesvirus)
Persistente	Liberación continua de virus	
Cáncer de cuello uterino	Mayor crecimiento celular	Papilomavirus humano
HIV/sida	Disminución de células T CD4+	HIV-1 y 2 (Lentivirus)
Cáncer hepático	Mayor crecimiento celular	Virus de la hepatitis B
Infección persistente por enterovirus	Deterioro mental asociado con sida	Echovirus
Encefalitis progresiva	Deterioro mental rápido	Virus de la rubéola
Panencefalitis esclerosante progresiva (PEEP)	Deterioro mental	Virus del sarampión

© Pearson Education, Inc.
© 2017 Editorial Médica Panamericana S.A.C.F.

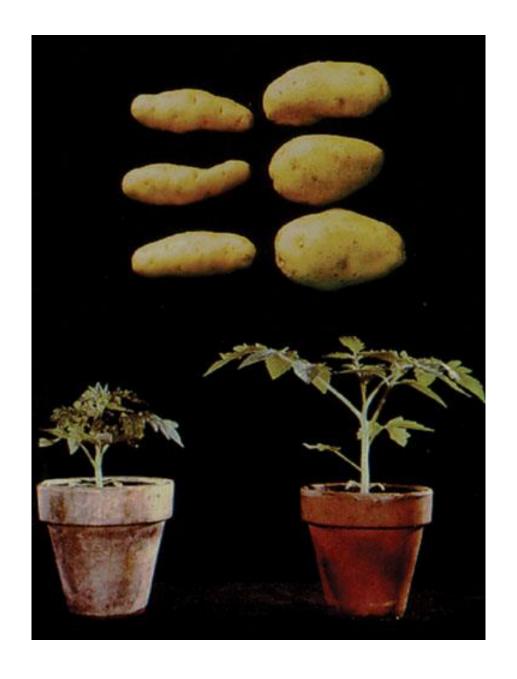
Entidades subvíricas: viroides y priones

Viroides

- Moléculas infecciosas de ARN monocatenario sin cápside proteica. 250-400 nucleótidos: no codifica proteínas



- No utiliza receptor para penetrar la célula hospedadora: ingreso por heridas. Réplica en núcleo o cloroplastos por RNApolimerasas
- Solamente causan enfermedades en los vegetales: viroide del tubérculo ahusado (fusiforme) de la papa



Entidades subvíricas: viroides y priones

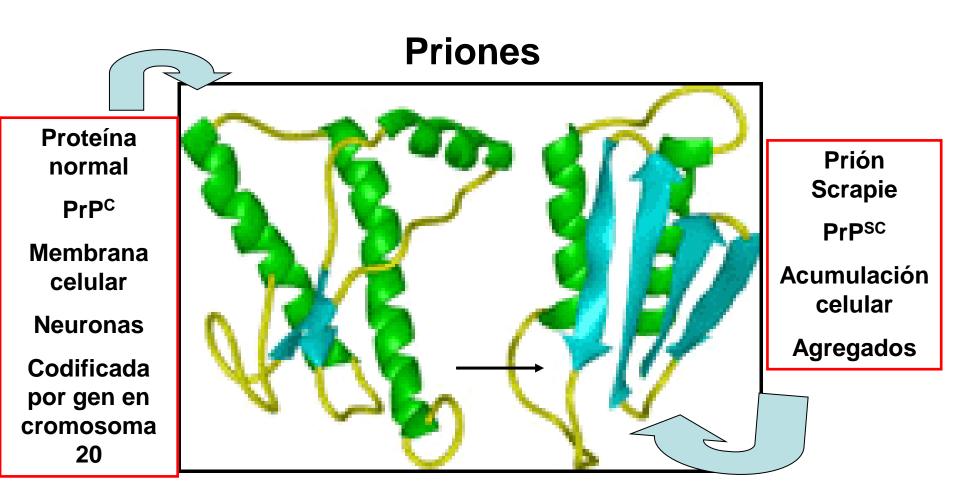
Priones

- Prión: pequeña partícula infecciosa proteica (1982)
- Patologías neurológicas: encefalopatías espongiformes (vacuolas en el cerebro)

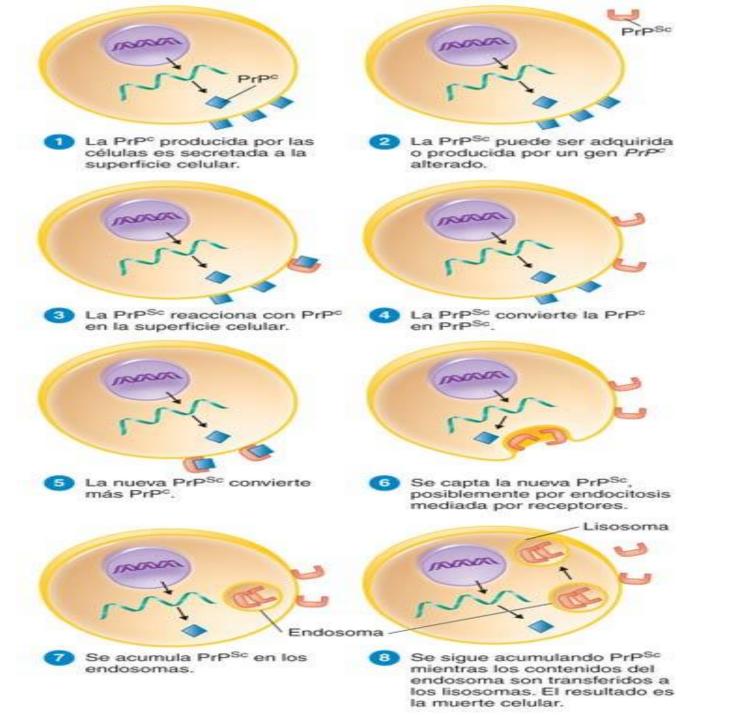
Humanos: Kuru - Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ)

Animales: Encefalopatía espongiforme bovina (vacas locas)

- Trasmisión: consumo de carne poco cocida a partir de ganado bovino infectado; instrumental contaminado empleado en trasplantes
- Hipótesis: Conversión de glucoproteína normal del huésped PrP^C a proteína infecciosa por contacto con proteína anómala PrP^{Sc}→ acumulación de PrP^{Sc}



- -Los priones son proteínas con una estructura anómala que son capaces de cambiar, por contacto, la estructura de una proteína normal
- Homología con proteína del huésped: falta de respuesta de anticuerpos

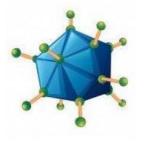


Pearson Education, Inc.
 2017 Editorial Médica Panamericana S.A.C.F.

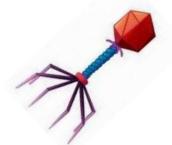
ACCIÓN DE LOS AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS SOBRE PRIONES

COMPARACIÓN VIRUS vs PRIONES	VIRUS	PRIÓN
Filtrable (infeccioso)	Sí	Si
Presencia ácido nucleico	Sí	No
Presencia de proteínas	Sí	Sí
Desinfección con		
Formaldehído	Sí	No
Proteasas	Algunos	Resistencia parcial
Calor (80°C)	La mayoría	No
Radiaciones ionizantes y UV	Sí	No 45

Implicancias prácticas de los virus



Patogenicidad



Fagotipificación (herramienta de diagnóstico)

Fagos para control de bacterias indeseables (uso terapéutico y ambiental)

Fagos en procesos industriales

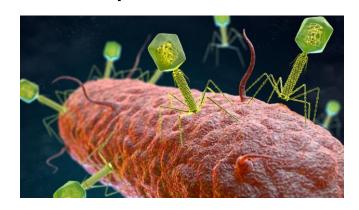
Virus patógenos transmitidos por alimentos

Características de los bacteriófagos («fagos»)

- Son los microorganismos más abundantes en el ambiente y están presentes en grandes cantidades en agua (10⁹ fagos/ml) y alimentos de varios orígenes (10⁸ fagos/g)
- Son «bacteria-específicos» → Importante para la fagotipia
- Inofensivos para los humanos, animales y plantas.
- Control ecológico de poblaciones bacterianas

Aplicaciones terapéuticas de los fagos

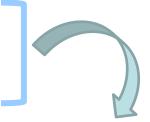
- Tratamiento de enfermedades: disentería, fiebres tifo y paratifoidea, cólera e infecciones del tracto urinario.
- Con el descubrimiento de los antibióticos, se abandonó la investigación sobre fagos en la mayoría del mundo occidental. Sin embargo, la aparición a nivel mundial de la resistencia de bacterias a los antibióticos renovó el interés por la terapia fágica.
- Algunos experimentos indican que la terapia fágica puede ser superior a los tratamientos con antibióticos.





Bacteriófagos en la Inocuidad Alimentaria

Listeria monocytogenes
Salmonella
Campylobacter
E. coli patógenico



(CrossMark

Coloniza instalaciones

Contaminación del alimento después del proceso de producción

Aplicar tratamiento con fagos en etapa donde surge la contaminación

Envasado Maduración "Feteado" Ambiente



Colonizan animales
Contaminación de carne
consumo
materia prima industria

Aplicar tratamiento con fagos

Cría de animales

Carne después del sacrificio

Food Control 73 (2017) 1474-1482



Applicability of commercial phage-based products against *Listeria* monocytogenes for improvement of food safety in Spanish dry-cured ham and food contact surfaces

Diana Gutiérrez, Lorena Rodríguez-Rubio ¹, Lucía Fernández, Beatriz Martínez, Ana Rodríguez, Pilar García **

nstituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain



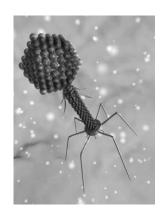


FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE Volume XX, Number XX, 2017 © Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/fpd.2016.2266





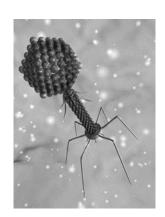
Use of Bacteriophages to Control *Escherichia coli* O157:H7 in Domestic Ruminants, Meat Products, and Fruits and Vegetables



Lili Wang,^{1,2} Kunli Qu,¹ Xiaoyu Li,^{1,2} Zhenhui Cao,³ Xitao Wang,^{1,4} Zhen Li,¹ Yaxiong Song,¹ and Yongping Xu^{1,2}

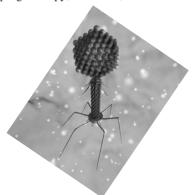
Abstract

Escherichia coli O157:H7 is an important foodborne pathogen that causes severe bloody diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic uremic syndrome. Ruminant manure is a primary source of E. coli O157:H7 contaminating the environment and food sources. Therefore, effective interventions targeted at reducing the prevalence of fecal excretion of E. coli O157:H7 by cattle and sheep and the elimination of E. coli O157:H7 contamination of meat products as well as fruits and vegetables are required. Bacteriophages offer the prospect of sustainable alternative approaches against bacterial pathogens with the flexibility of being applied therapeutically or for biological control purposes. This article reviews the use of phages administered orally or rectally to ruminants and by spraying or immersion of fruits and vegetables as an antimicrobial strategy for controlling E. coli O157:H7. The few reports available demonstrate the potential of phage therapy to reduce E. coli O157:H7 carriage in cattle and sheep, and preparation of commercial phage products was recently launched into commercial markets. However, a better ecological understanding of the phage E. coli O157:H7 will improve antimicrobial effectiveness of phages for elimination of E. coli O157:H7 in vivo.



Keywords: bacteriophage, E. coli O157:H7, phage therapy, ruminants, food





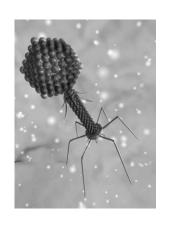




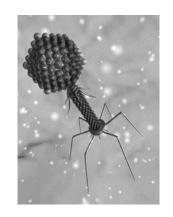
Perspectivas para el uso de fagos



 Lucha contra bacterias peligrosas y no deseadas



 Facilidad de uso - Mejoramiento de la seguridad del alimento sin afectar sus propiedades organolépticas y sin efectos secundarios negativos.



Solución natural







Biotecnología Alimentaria

Uso de tecnologías biológicas para la producción, transformación y/o preservación de alimentos, o bien para la producción de las materias primas, aditivos o adyuvantes empleados en la industria alimentaria







Procesos de fermentación en alimentos

- espontáneo: cacao
- inoculados: vino, yogur, queso, sauerkraut (chucrut), fiambres, etc.



Procesos de fermentación en medios de cultivo

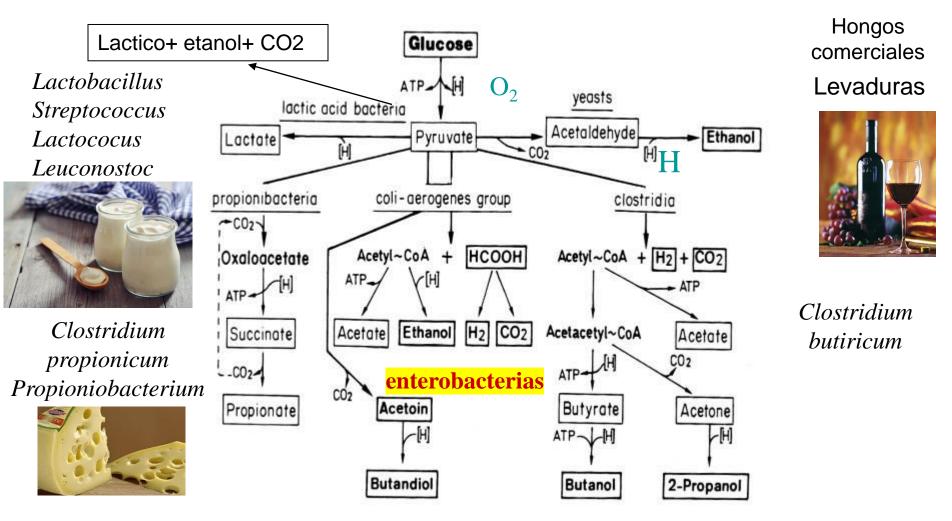
- Producción de biomasa: levadura de pan, starters
- Obtención de metabolitos: aminoácidos, ác. orgánicos
- Obtención de aditivos y adyuvantes: sabores, aromas, espesantes y estabilizadores

Procesos enzimáticos

elaboración de materias primas: endulzantes, jarabes en alimentos: malteado, coagulación de leche

53

PRODUCTOS, REACCIONES Y GRUPOS MICROBIANOS RESPONSABLES DE LOS PROCESOS FERMENTATIVOS MÁS IMPORTANTES



Los grupos que más interesan desde el punto de vista alimentario son: enterobacterias y clostridium (Sanitario), y bacterias lácticas, propionibacterias y levaduras (Productivo)

Cultivos iniciadores ("Starter Cultures")

- Cultivos starter: microorganismos que se emplean en la producción lácteos fermentados (queso y yogur).

Microbiota natural de la leche: ineficiente, incontrolada e impredecible, y se destruye con tratamiento térmico a que se somete la leche. Un cultivo starter provee las características particulares deseadas en forma más controlable y predecible.

- Función primaria de los cultivos iniciadores lácticos es la producción de acido láctico a partir de la lactosa.
- Otras funciones de los cultivos starters son:
 - sabor, aroma, y producción de etanol
 - actividad proteolítica y lipolítica
 - inhibición de microorganismos indeseables

Lactococcus (lactis, cremoris, L. lactis var diacetylactis), Lactobacillus (bulgaricus, acidophilus, plantarum, helveticus) y Pediococcus cerevisiae.



Bacteriófagos



(-) En los procesos de elaboración de quesos → atacan a bacterias lácticas, impidiendo el proceso normal de fermentación o tornándolo lento e ineficiente. Se controlan mediante la higiene ambiental y utilizando cepas bacterianas resistentes

(+) Herramienta para mejoramiento genético de bacterias lácticas a través del proceso de transducción especializada

Ej: Incorporación de genes de actividad proteolítica por transducción especializada

En la industria láctea es importante la detección de fagos autóctonos

- La información sirve para encontrar formas efectivas para controlarlos
- La Universidad Nacional del Litoral (UNL) tiene la única Fagoteca de América Latina en el Instituto de Lactología Industrial



Los fagos no se pueden eliminar, se controlan mediante la higiene ambiental y utilizando cepas bacterianas resistentes

57

TRANSMISIÓN DE VIRUS A TRAVÉS DE ALIMENTOS

- Poliomielitis: a través de leche cruda no pasteurizada
- Hepatitis: a través de consumo de mariscos contaminados
- Aguas: hepatitis, poliomielitis, virus causantes de trastornos
 GI



Persistencia en los alimentos

Protección de la inactivación (productos lácteos, huevo, embutidos)