

**Министерство сельского хозяйства РФ  
Документ научно-технической политики министерства образования  
ФГБОУ ВО Волгоградский аграрный университет**

**Кафедра «Инфекционная патология и судебная  
ветеринарная медицина»**

**Дисциплина «Ветеринарная вирусология»**

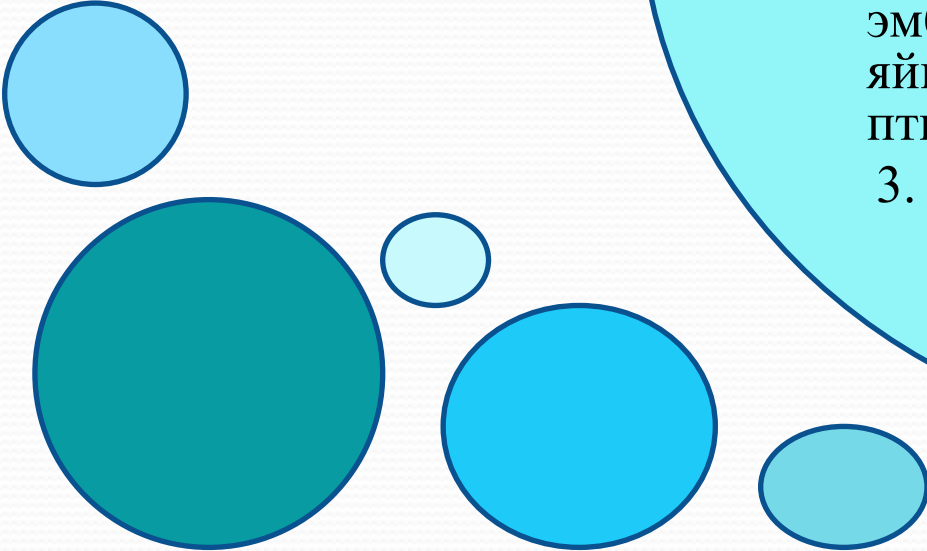
**Доклад на тему: «Принципы культивирования  
вирусов»**

Выполнил студент очного отделения  
факультета биотехнологий и ветеринарной медицины  
специальности «Ветеринария» группа В-32

Мещерякова В.А.

Проверил доцент: Фирсов Г.М.

2016 г.



В настоящее время существуют следующие методы культивирования вирусов:

1. на восприимчивых домашних и лабораторных животных (телята, мыши, белые крысы, кролики, морские свинки, хомяки, цыплята);
2. на развивающихся куриных эмбрионах, деэмбрионированных яйцах и эмбрионах других видов птиц;
3. в культурах ткани и клеток.

## **Культивирование вирусов на восприимчивых домашних и лабораторных животных.**

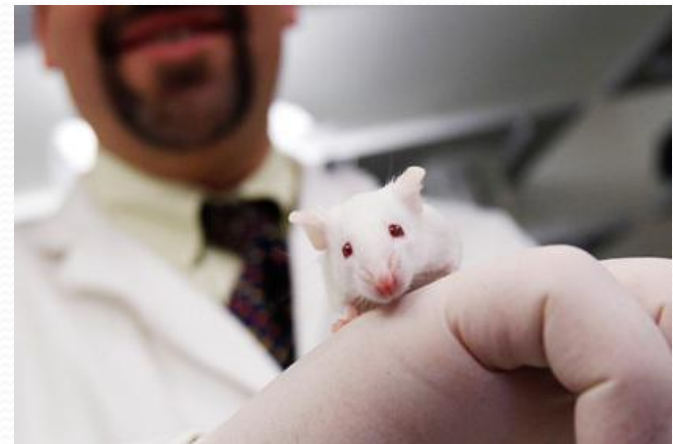
Вирусы различных групп могут быть культивированы в организме восприимчивых домашних или лабораторных животных. Наиболее широко, в том числе в лабораторных условиях, применяют культивирование вирусов на белых крысах, кроликах, белых мышах, хомяках, цыплят. У молодых мышей экспериментально воспроизводят грипп, флавивирусные инфекции, ящур. Они восприимчивы ко многим вирусам, их легко разводить и с ними удобно работать. Лучше использовать мышей инбредных линий, так как они почти одинаково реагируют на тот или иной вирус..

Ту или иную инфекцию иногда изучают на животных нескольких видов, обладающих разной чувствительностью к данному вирусу, что позволяет дифференцировать вирусы, вызывающие клинически сходные симптомы болезни.



**На чувствительность животных к вирусам влияют следующие факторы:**

1. Возраст.
2. Наличие неспецифических ингибиторов, которые выполняют защитную функцию организма.
3. Пол животных. Наиболее чувствительны особи женского пола — самки (болезнь Марека), менее — мужского пола (самцы).
4. Генетические линии. Одни животные более чувствительны, другие — резистентны.



## По генетическим качествам лабораторных животных делят на четыре группы:

- 1) животные смешанного происхождения, полученные от разных животноводов, такие животные гетерогенны;
- 2) животные, полученные непосредственно из одного источника, однако генетически такие животные переменны;
- 3) инбредные линии животных. Их получают в результате спаривания брата с сестрой или родителей с детьми по крайней мере не менее 20 поколений.
- 4) однородные гибриды F1. Высокая степень гетерозиготности, характерная для каждого гибрида, связана здесь с генетическим единообразием, которое соответствует степени гомозиготности родительских линий.



Отрицательная сторона выделения вируса на лабораторных животных — возможность диагностических ошибок вследствие активации скрытого вирусоносительства.

В последнее время для обнаружения вируса в определенном окружении используют «сторожевых» животных», т. е. животных, выставляемых в качестве поста в целях выявления инфекционного агента. В лабораториях таких животных используют для выявления утечки вируса. Другим недостатком выделения вирусов на животных является то, что для их содержания и кормления требуются немалые материальные затраты.



## Культивирование вирусов на куриных эмбрионах.

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах — наиболее доступный и удобный метод как для первичного выделения вирусов от больных животных и из объектов внешней среды, так и для последующего культивирования вирусов в лаборатории. Этот метод широко применяется для идентификации вирусов и антител, а также для приготовления вакцин и диагностикумов.

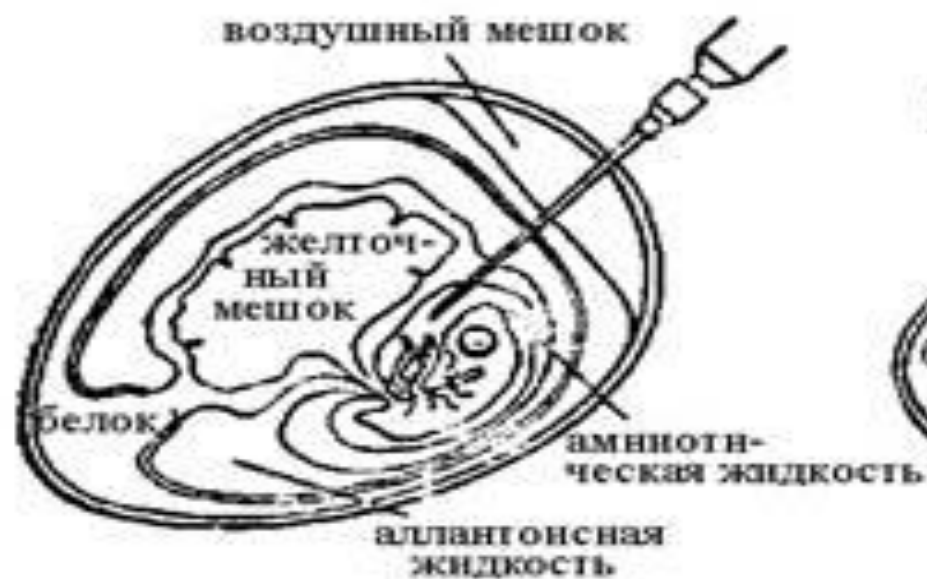
В куриных эмбрионах, поскольку они содержат четыре различных биологических субстрата: амнион, аллантоис, хорион-аллантоисную мембрану и желточный мешок, — способны размножаться многие вирусы. Они пригодны для выделения и титрования вирусов, получения антигенов, постановки реакции нейтрализации и т. д. В ряде случаев при инокуляции вирусосодержащего материала куриный эмбрион проявляет признаки данной инфекции, однако он не всегда свободен от посторонних вирусов и не образует антител. Преимущество куриных эмбрионов как биологической системы также в их сравнительно невысокой стоимости и доступности для любой диагностической лаборатории.



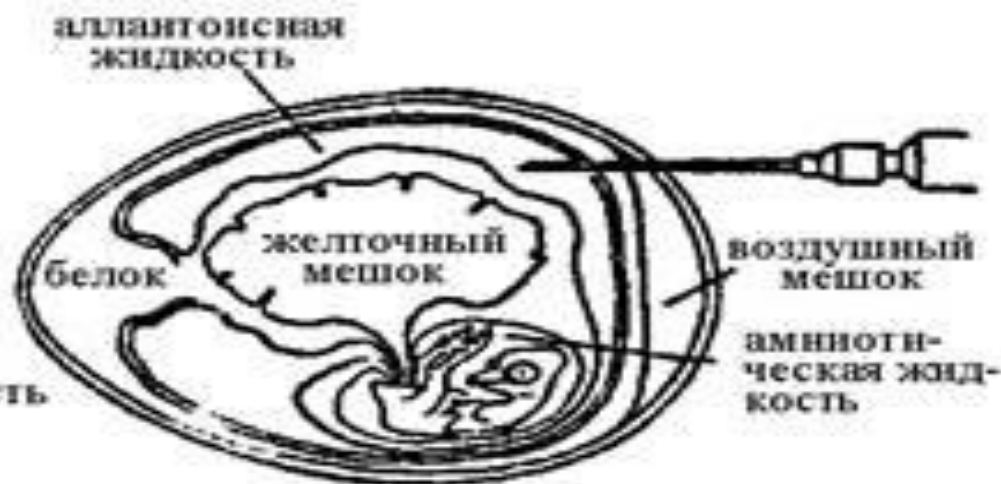
Рисунок 1. Способы заражения куриного эмбриона:

1 – в полость амниона

воздушный мешок



2 – на хорионаллантоисную оболочку.



3 – в полость аллантоиса

Хорионаллантоисная оболочка



4 – в желточный мешок.





## Условия, влияющие на размножение вирусов в куриных эмбрионах.

1. Температура от 35 до 37 °С является оптимальной для размножения вирусов гриппа.
2. Возраст эмбриона. В зависимости от вида вируса, способа заражения и задач исследования используют эмбрионы в возрасте 8—12 дней. Для культивирования вирусов гриппа чаще берут 9—10-дневные эмбрионы.
3. Концентрация введенного вируса существенно влияет на размножение вируса. Введение неразведенного вируса вызывает менее обильное накопление инфекционного вируса. Оптимальные дозы заражения вирусами осповакцины — от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-3</sup>.
4. Метод заражения. При заражении в амнион и желточный мешок вирус осповакцины накапливается медленно и в низких титрах, а эмбрионы погибают через 48 ч, поражения на оболочках появляются в меньшем количестве.



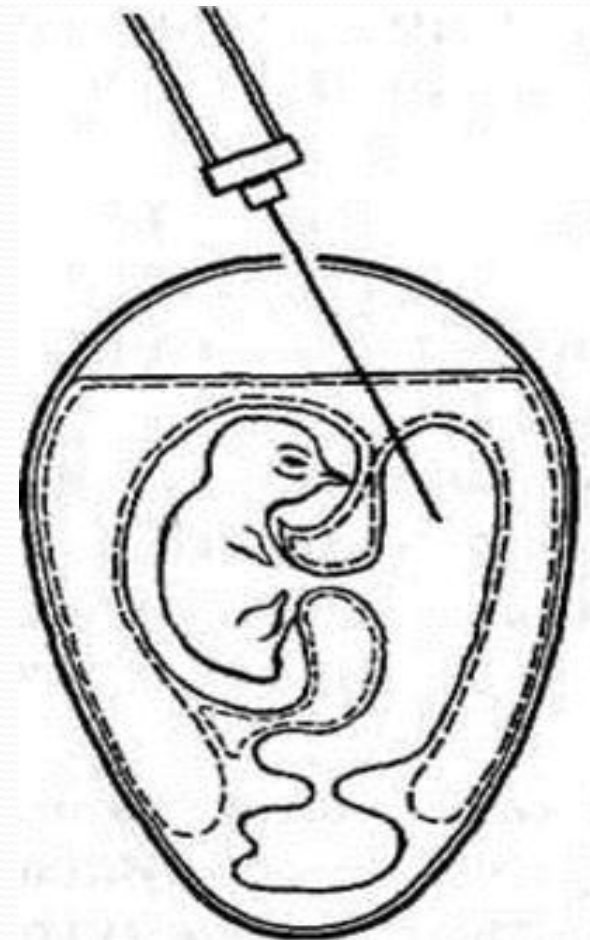
## Деэбринированные яйца.

В основе метода лежит удаление эмбриона из яйца в период, когда к его скорлупе изнутри полностью прилегает хорионаллантоисная оболочка. Если внутрь такого яйца добавить питательную среду, то образуется своеобразная культура ткани, в которой может размножаться вирус.



## Недостатки метода культивирования вирусов в куриных эмбрионах:

- ❖ куриные эмбрионы могут быть носителями микроорганизмов (сальмонеллы, туберкулезная палочка), в том числе вирусов (лейкоз птиц, бронхит кур и др.) и противовирусных антител;
- ❖ не все вирусы культивируются в куриных эмбрионах.



## Культивирование вирусов в культурах ткани и клеток.

**Культура тканей** — сборное понятие, обозначающее систему, в которой клетки, ткани или органы сохраняют жизнеспособность или способность размножаться *in vitro* более 24 ч. В зависимости от вида биологического объекта различают: **культуру клеток**— термин, который обозначает рост клеток *in vitro* и включает в себя также рост единичных клеток (клетки в культуре не образуют ткань); **культуру тканей или органов** — термин, который обозначает поддержание роста тканей зачатков органов или их частей *in vitro* при сохранении их дифференцировки, структуры и (или) функции.



## Типы клеточных культур.

1. *Первичные (трипсинизированные) культуры*- фибробласты эмбриона курицы (ФЭК), человека (ФЭЧ), клетки почки различных животных и т. д. Первичные культуры получают из клеток различных тканей чаще путем их размельчения и трипсинизации, используют однократно, т.е. постоянно необходимо иметь соответствующие органы или ткани.
2. *Линии диплоидных клеток* пригодны к повторному диспергированию и росту, как правило не более 20 пассажей (теряют исходные свойства).
3. *Перевиваемые линии* (гетероплоидные культуры), способны к многократному диспергированию и перевиванию, т.е. к многократным пассажам, наиболее удобны в вирусологической работе- например, линии опухолевых клеток HeLa, Нер и др.



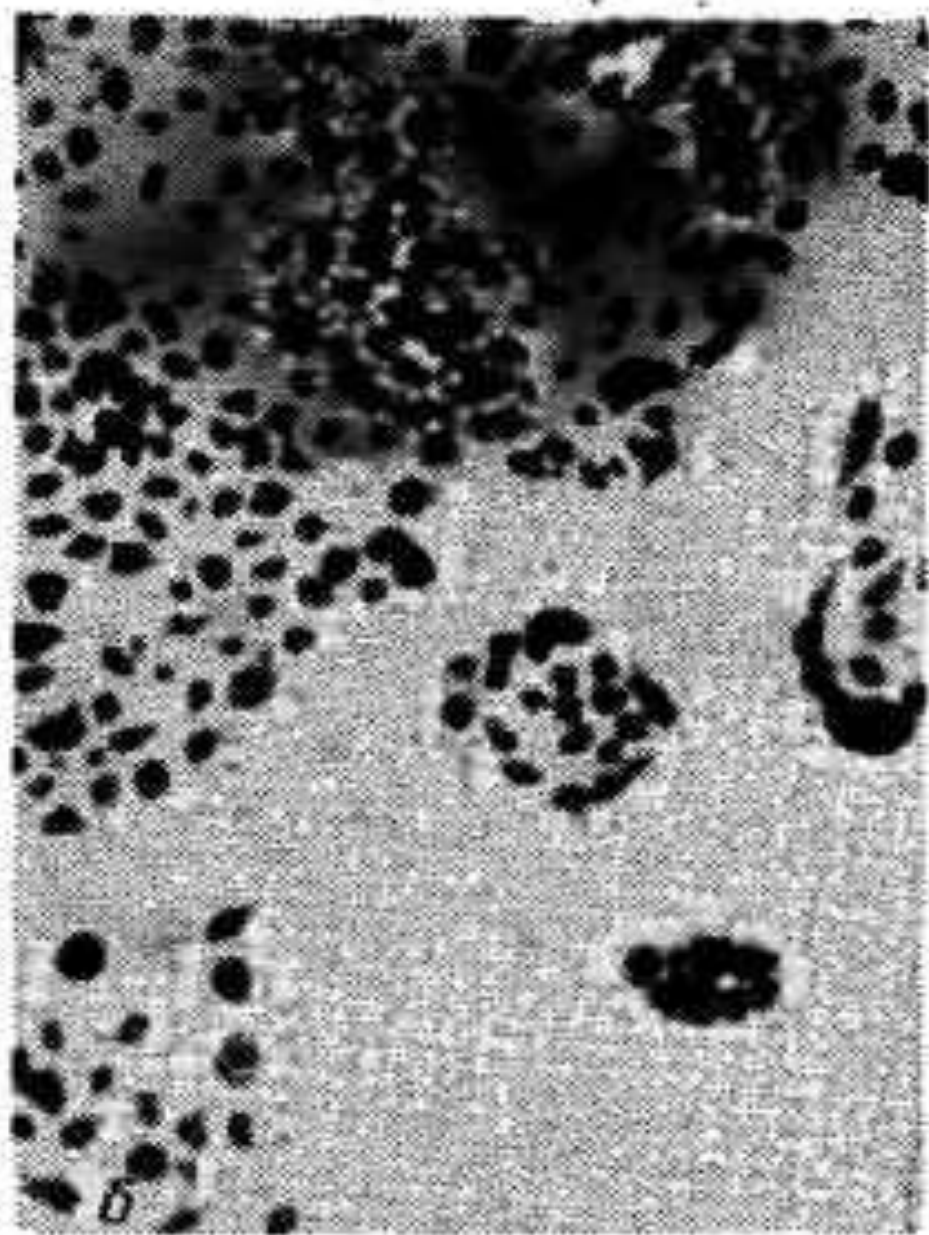
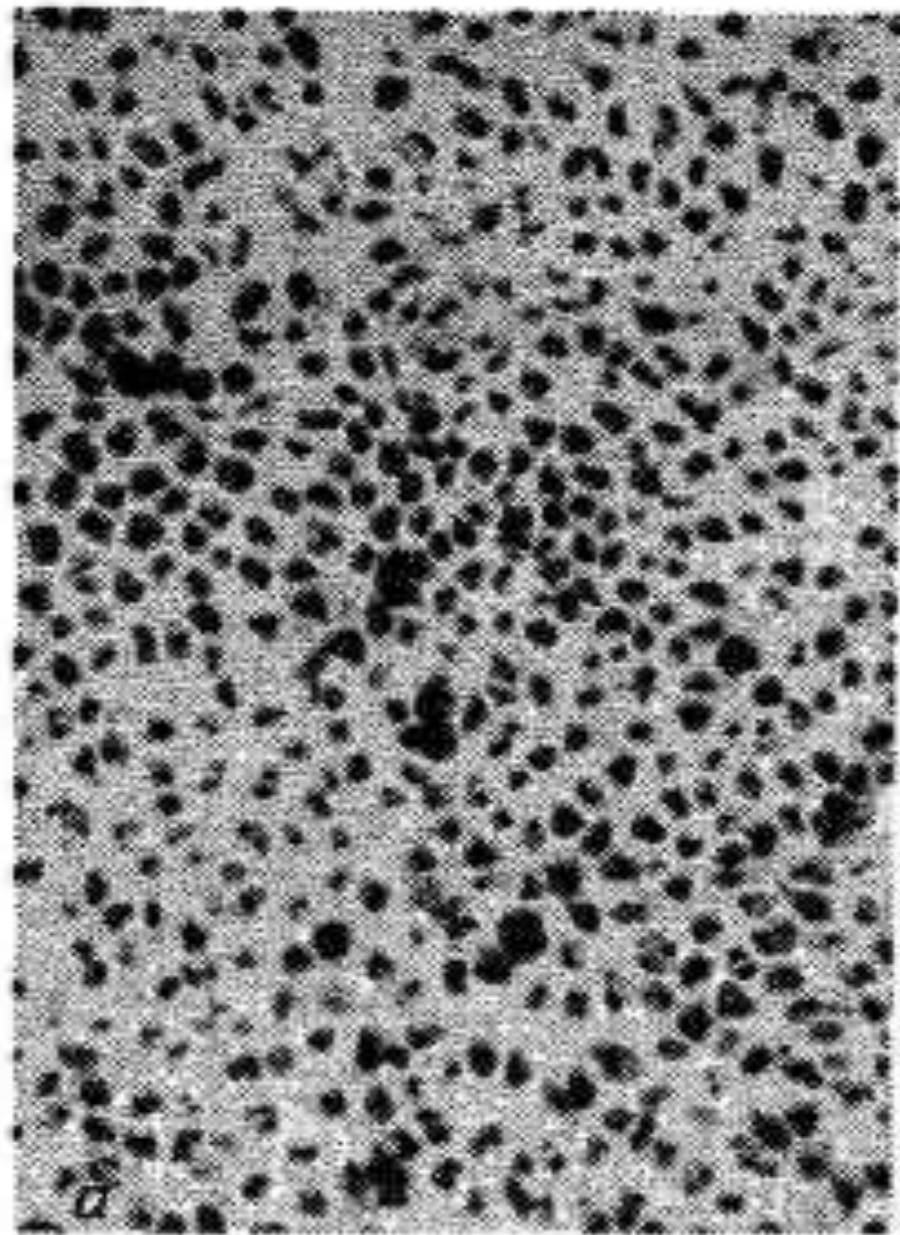


Рис. 31. Культура клеток.

*a* — неизмененные клетки; *b* — цитопатические изменения в клетках (ШПД).

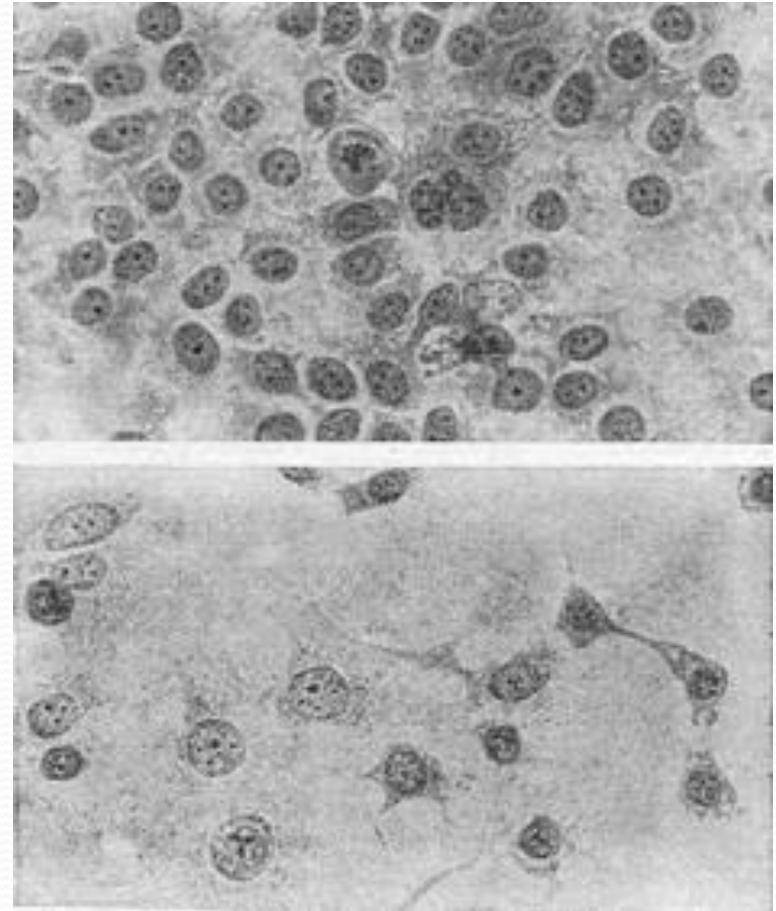
## **Выявляемые проявления вирусной инфекции клеточных культур:**

1. Цитопатический эффект.
2. Выявление телец включений.
3. Выявление вирусов методом флюоресцирующих антител (МФА), электронной микроскопией, авторадиографией.
4. Цветная проба. Обычный цвет используемых культуральных сред, содержащих в качестве индикатора рН феноловый красный, при оптимальных для клеток условиях культивирования (рН около 7,2)- красный. Размножение клеток меняет рН и соответственно- цвет среды с красного на желтый за счет смещения рН в кислую сторону. При размножении в клеточных культурах вирусов происходит лизис клеток, изменения рН и цвета среды не происходит.
5. Выявление гемагглютинаина вирусов- гемадсорбция, гемагглютинация.
6. Метод бляшек (бляшкообразования). В результате цитолитического действия многих вирусов на клеточные культуры образуются зоны массовой гибели клеток. Выявляют бляшки- вирусные “клеточно- негативные” колонии.



**Культивирование вирусов в культурах тканей применяют в следующих случаях:**

- ❖ для замены лабораторных и домашних животных;
- ❖ получения большого количества вирусов, необходимых для производства биологических препаратов — вакцин, сывороток и диагностикумов;
- ❖ изучения развития вирусов в зараженных клетках



**Однослойная культура клеток HeLa до заражения вирусом.**



# Культуры тканей различают в зависимости от условий выращивания клеток.

1. *Культуры переживающих тканей* в жидкой среде и на агаре, которые или вообще не размножаются *in vitro*, или дают очень слабый рост, т. е. в них отсутствует процесс размножения клеток.
2. *Культуры растущих клеток* – клетки активно делятся и размножаются



## Список литературы.

1. Белоусова, Р. В. Ветеринарная вирусология: учебник / Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская, И. В. Третьякова; Международная ассоциация "Агрообразование". - М.: КолосС, 2007. - 424 с.
2. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология.- 3-е изд., перераб. и доп. /Госманов Р.Г., Колычев Н.М., Плешакова В.И.- М.: Лань, 2010.- 480 с.
3. Корочкин, Р.Б. Культивирование вирусов в культурах клеток : учеб.- метод. пособие / Р. Б. Корочкин, А.А.Вербицкий, В.Н. Алешкевич, А.В. Сандул. – Витебск: ВГАВМ, 2010.
4. Красникова Е.С. Вирусология и биотехнология: краткий курс лекций для студентов 3 курса специальности 36.05.01 Ветеринария /Е.С. Красникова // ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ.- Саратов, 2016.
5. Сюрин, В.Н. Ветеринарная вирусология: учебник для вузов по специальности «Ветеринария» / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: Агропромиздат, 1991. – 432 с.: ил.
6. Фирсов Г.М. Вирусология и биотехнология: учебное пособие/ Г.М. Фирсов, С.А. Акимова. – Издание 2-е дополненное.- Волгоград: ФГБОУ ВПО Волгоградский ГАУ, 2015. – 232 с.
7. <http://www.studfiles.ru/preview/5163683/page:2/>
8. [http://studopedia.ru/2\\_121735\\_metodi-kultivirovaniya-virusov.html](http://studopedia.ru/2_121735_metodi-kultivirovaniya-virusov.html)
9. <http://www.vsavm.by/wp-content/uploads/2013/10/Kultivirovanie-virusov-v-kulture-kletok.pdf>