	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет»	Методические указания
		Ветеринарная вирусология и биотехнология

Кафедра инфекционных болезней,
зоогигиены и ветсанэкспертизы

ВЕТЕРИНАРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

КУРИНЫЕ ЭМБРИОНЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ к лабораторной работе

Направление подготовки (специальность)
3.36.05.01 Ветеринария

Профиль подготовки
(специализация, магистерская программа, направленность программы)
Болезни сельскохозяйственных и домашних животных
Ветеринарно-санитарная экспертиза
Ветеринарная фармация

Квалификация (степень) выпускника
Ветеринарный врач

Форма обучения
очная, заочная

Уфа 2018

УДК637.12.04/.07:378.147

ББК 36.95+74.58

Н32

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета биотехнологий и ветеринарной медицины (протокол №9 от « 29 » марта 2018 г.)

Составитель: доцент, канд. биол. наук О.Н. Николаева

Рецензент: доцент кафедры морфологии, патологии, фармации и незаразных болезней Базекин Г.В.

Ответственный за выпуск: зав. кафедрой инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы, д-р биол. наук, профессор Андреева А.В.

КУРИНЫЕ ЭМБРИОНЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

Цель: 1. Подготовить куриные эмбрионы (КЭ) к заражению.

2. Взять и подготовить материал для заражения КЭ.

3. Изучить методы заражения куриных эмбрионов.

4. Вскрыть зараженный куриные эмбрионы, получить ХАО и аллантоисную жидкость.

5. Поставить капельную РГА с аллантоисной жидкостью.

Оборудование и материалы: Куриные эмбрионы 9- и 11-дневные; овоскопы; кюветы эмалированные размером 24х36 см с марлевыми салфетками; штативы для пробирок; штативы для фиксации эмбрионов; горелки спиртовые или газовые; груши резиновые; тампоны ватные на палочках; спирт йодированный; кусочки ваты в бумажных упаковках стерилизованные (ватики); пробирки под резиновыми пробками; чашки Петри.

1 Общие сведения.

Куриные эмбрионы (КЭ) как живая система вошли в вирусологическую практику в 30-х годах XX в. Их использование расширило спектр культивируемых в лабораторных условиях вирусов, позволило более успешно решать стоящие перед вирусологией задачи в связи с тем, что куриные эмбрионы имеют ряд преимуществ перед лабораторными животными.

Используют куриные эмбрионы в вирусологии в основном для тех же целей, что и лабораторных животных, а именно: обнаружения в патматериале активного вируса биопробой; первичного выделения вируса. Эффективно выделяют и культивируют на куриных эмбрионах вирусы, вызывающие заболевания у птиц, а также некоторые вирусы млекопитающих; поддержания вирусов в лаборатории; титрования вирусов; накопления вируса для лабораторных исследований и получения вакцин.

Строение куриного эмбриона. Обычно курица откладывает оплодотворенной яйцо, в котором зародыш находится на стадии бластулы или ранней гаструлы. При нагревании яйца до температуры, близкой к температуре тела курицы, происходит дальнейшее развитие зародыша. В период с 5-го по 12-й день инкубации куриные эмбрионы могут быть использованы для заражения вирусами.

Яйцо с развивающимся куриным эмбрионом покрыто твердой скорлупой, к которой плотно прилегает подскорлупная оболочка. Последняя в тупом конце яйца разделяется на два листка, между которыми образуется воздушная камера. Тело зародыша лежит в яйце эксцентрично, спиной ближе к скорлупе, голова направлена в сторону воздушной камеры. Зародыш погружен в околоплодную жидкость, заполняющую амниотическую полость, и пуповиной связан с желтком. Желток располагается эксцентрично и относительно зародыша как бы по другую сторону продольной оси.

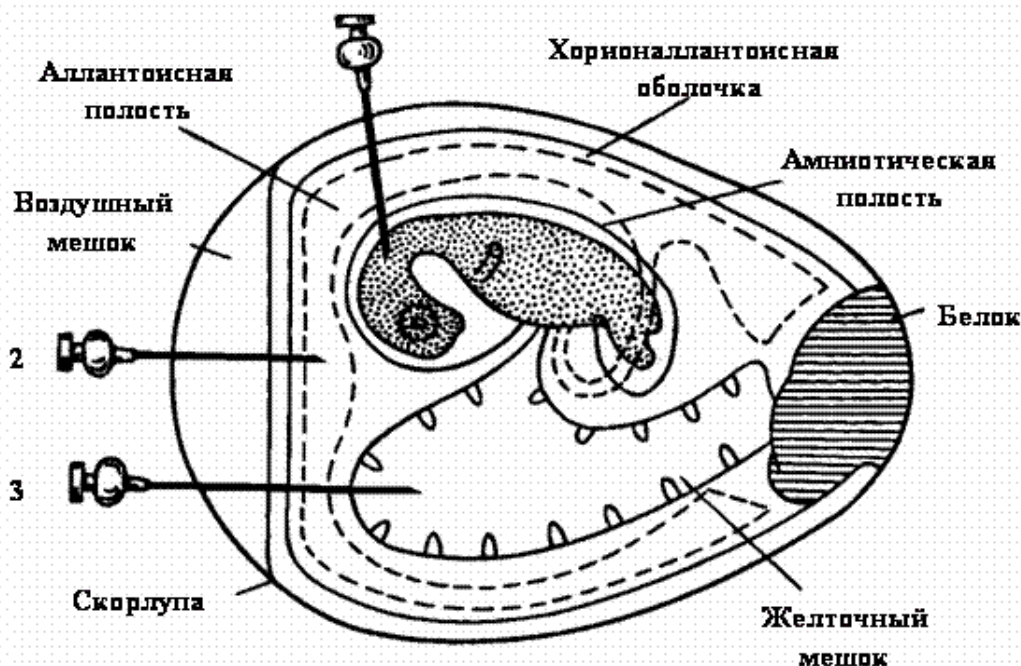


Рисунок. Схематический разрез куриного эмбриона на 8-й день инкубации:

1- скорлупа; 2 - подскорлупная оболочка; 3 - хорionoаллантоисная оболочка; 4 - аллантоисная полость; 5 - желточный мешок; 6 - белок; 7 - воздушная камера; 8- тело зародыша; 9 - амниотическая полость. Непосредственно под скорлупной оболочкой находится *аллантоисная полость*, покрывающая амнион и желточный мешок, а к 10-11-му дню замыкающая в остром конце яйца. В процессе развития аллантоисная оболочка срастается с хорionicом, образуя единую *хорionoаллантоисную оболочку* (ХАО). В остром конце яйца находится остаток белка.

Размножение вируса возможно во всех структурах эмбриона, имеющих клеточное строение, к которым относится зародыш, ХАО и желточный мешок. Накопление вирусов происходит в тех же структурах, но ряд вирусов может накапливаться в аллантоисной и амниотической жидкостях, образуя практически суспензию вируса.

Заражение в ту или другую часть эмбриона проводится в период её максимального развития, когда количество чувствительных клеток будет наибольшим.

Амниотическая полость, являясь буферной средой развития зародыша, покрывает его уже на 5-й день инкубации. Среднее количество жидкости к середине периода инкубации составляет около 1 мл. Для заражения в амниотическую полость используют эмбрионы в возрасте 6-10 дней.

Аллантоисная полость служит для сбора продуктов обмена, в ней скапливаются мочекислые соли. В процессе роста и развития зародыша аллантоисная жидкость приобретает кислую реакцию. Заражение производят на 9-10 день инкубации.

Хорionoаллантоисная оболочка богата кровеносными сосудами, которые тесно прилегая к внутренней поверхности пористой скорлупы, насыщаются кислородом и снабжают им тело зародыша, выполняя функцию органов дыхания эмбриона. Заражение на ХАО проводят на 10-12 день инкубации.

Подготовка куриных эмбрионов к заражению. Эмбрионы доставляют из инкубатория, не допуская их охлаждения в пути. В лаборатории эмбрионы инкубируют в термостате при температуре 37° С и влажности 60-70%, что достигается установлением в термостате открытых широкогорлых сосудов с водой. Вентиляционные отверстия термостата должны быть открыты. Эмбрионы размещают воздушной камерой вверх в специальных штативах. Рекомендуется до момента заражения дать возможность эмбрионам в течение суток адаптироваться к новым условиям и нормализовать свои функции после транспортного стресса. Если лаборатория располагает собственным инкубаторием, то снесенные курицей оплодотворенные яйца пригодны для закладки в него в течение 10 дней.

Подготовка куриных эмбрионов к заражению включает овоскопирование и дезинфекцию скорлупы, а также соответствующую подготовку рабочего места. Овоскопирование представляет собой просмотр яиц против достаточно яркого источника света (овоскоп), в результате чего на неосвещенной стороне скорлупы образуются тени от внутренних структур. Овоскопирование проводят в затемненном помещении. При этом на скорлупе графитным карандашом отмечают границу воздушной камеры, место расположения зародыша и участок бессосудистой зоны размером 0,5*0,5 см. Эти отметки служат ориентиром при выборе места введения вирусосодержащего материала. При овоскопировании также определяют, жив зародыш или погиб. Зародышей, проявляющих активные движения при хорошей кровенаполненности сосудов ХАО, считают живыми.

Куриные эмбрионы заражают в асептических условиях (лучше в боксе). В предбоксе скорлупу эмбрионов обрабатывают йодированным спиртом, затем уже в боксе повторно протирают, а иногда еще и фламбируют - обрабатывают пламенем смоченного спиртом тампона. Эмбрионы фиксируют в специальных подставках, установленных в эмалированной кювете на 3-4- слойной марлевой салфетке, смоченной дезинфицирующим раствором.

В работе используют инструменты, стерилизованные кипячением. Их ставят в баночку со спиртом и обжигают пламенем горелки перед каждым повторным использованием.

Взятие, пересылка и подготовка материала для заражения КЭ.

1. С целью выделения вируса используют смывы от больных животных (напр., при гриппе лошадей используют носовые смывы в первые 2-3 дня от начала заболевания). Материал из носовых полостей берут стерильными тампонами, смоченными физраствором поваренной соли. Такими тампонами тщательно протирают носовые ходы и опускают их в стерильные пробирки.

2. Если транспортировка материала продолжается более 4 ч, тампоны следует поместить в термос со льдом и в таком виде доставить в лабораторию для исследования.

3. В лаборатории тампоны тщательно отжимают. Полученную жидкость, содержащую слизь, обрывки ткани и другие аморфные частицы, центрифугируют при 4 тыс. об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость отсасывают в стерильные пробирки, добавляют антибиотики (пенициллин и стрептомицин) по 500 ЕД/мл и выдерживают при 4° С в течение одного часа, после чего используют для заражения КЭ.

Признаки размножения вируса в курином эмбрионе. Показателем заражения эмбриона вирусом может служить его гибель в характерные для данного вируса сроки. Другой признак размножения вируса - патологоанатомические изменения, появляющиеся в различных структурах эмбриона. Так, ХАО может быть отечной, иметь кровоизлияния, узелки, или, как их называют, оспины. Такого рода поражения наблюдаются при заражении куриных эмбрионов вирусами оспы птиц, инфекционного ларинготрахеита птиц, болезни Ауески и некоторыми другими. При этом размер и морфология оспин заметно различаются при размножении разных вирусов. Сам зародыш может отставать в росте и развитии от незараженных, т. е. проявлять феномен карликовости. Тело его может быть в разной степени обезвожено или мумифицировано, шея характерно перекручена. Названные признаки характерны для инфекционного бронхита кур. Кожа зародыша может быть гиперемирована, с кровоизлияниями. Внутренние органы также могут иметь признаки размножения вируса. Например, набухшая желто-зеленого или темно-зеленого цвета печень куриного эмбриона - признак размножения в нем вируса гепатита утят.

Встречаются вирусы (например, штамм В1 вируса ньюкаслской болезни), которые, размножаясь в курином эмбрионах, не вызывают ни их гибели, ни патологоанатомических изменений. Обнаружить такой вирус можно лишь в том случае, если он обладает способностью агглютинировать эритроциты, т.е. с помощью реакции гемагглютинации (РГА). Явление гемагглютинации представляет собой соединение эритроцитов в хлопья при добавлении к нему суспензии вируса. Гемагглютинирующими свойствами обладают те вирусы, вирионы которых имеют на поверхности рецепторы, способные взаимодействовать с рецепторами оболочек эритроцитов. Такие вирионы адсорбируются на поверхности эритроцитов. Адсорбция одного вириона одновременно на двух эритроцитах ведет к тому, что последние оказываются соединенными между собой, а адсорбированный вирион играет роль мостика между ними.

Образованием таких мостиков между многими эритроцитами и объясняется склеивание эритроцитов в хлопья.

Образование хлопьев, видимых невооруженным глазом, можно наблюдать при смешивании капли суспензии вируса с каплей отмытых эритроцитов на плоской поверхности (секла, керамики и др.). При смешивании суспензии эритроцитов и вируса в пробирке хлопья эритроцитов оседают ровным слоем на дно в форме так называемого зонтика.

РГА используют для титрования и обнаружения вирусов. Хлопья эритроцитов появляются через 5-10 мин после смешивания капли вируссодержащей жидкости и капли взвеси эритроцитов. Положительная гемагглютинация не только указывает на присутствие вируса, но и выявляет его гемагглютинирующую активность с определенным видом эритроцитов, что может служить вспомогательным диагностическим признаком.

Нередко при вскрытии эмбриона не удается обнаружить ни одного признака размножения вируса, хотя он и находится в исследуемом материале.

2 Порядок выполнения работы.

Произвести отбор и подготовку материала от больных животных, после чего произвести заражение КЭ одним из методов.

Перед каждым студентом ставят эмалированную кювету, дно которой застлано марлевой 3-4-слойной салфеточкой, смоченной дезинфицирующим раствором. В кювете располагают ближе к себе штатив для эмбрионов, а сразу за ним горелку. Справа держат баночку с йодированным спиртом, в которую ставят стерилизованные инструменты. Перед использованием извлеченные из баночки инструменты обжигают пламенем, а после использования вновь помещают в баночку. Скорлупу пробивают инъекционной иглой №18-20, вколотой в резиновую пробку.

На третий день инкубации вскрыть куриные эмбрионы и изучить признаки размножения вируса.

3 Вопросы для самоконтроля знаний:

1. Для чего используют куриные эмбрионы в вирусологии?
2. Каково строение развивающегося куриного эмбриона?
3. Какие методы можно использовать для заражения куриных эмбрионов вирусами?
4. Какие признаки указывают на размножение вируса в курином эмбрионе?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Барышников, П. И. Ветеринарная вирусология [Текст] : учебное пособие для студ. вузов, обучающихся по спец. 111201 - "Ветеринария" : рек. УМО по образованию / П. И. Барышников. - М. : ФОРУМ, 2009. - 96 с.
2. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология: учебник для студ. вузов по спец. 111201 «Ветеринария» / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев. – 2-е изд., перераб. и доп.. – М.: КолосС, 2006. – 304 с.
3. Белоусова, Р.В. Ветеринарная вирусология: учебник для студ. вузов по спец. 111201 «Ветеринария» / Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В. Третьякова; под ред. Р.В. Белоусовой; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 423 с.
4. Белоусова, Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии: учебн. пособие для студ. вузов по спец. 310800 «Ветеринария» / Р.В.Белоусова. - 3-е изд. - М.: КолосС, 2006.- 248 с.
5. Практикум по биотехнологии Тихонов И.В. [и др.]. - М.: Изд-во «Киселева Н.В.», 2010. - 330 с.
6. Кудачева, Н. А. Общая ветеринарная вирусология [Текст] : учебное пособие / Н. А. Кудачева ; МСХ РФ, Самарская ГСХА. - Самара : РИЦ СГСХА, 2010. - 300 с.
7. Быков, А.С. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / А.С. Быков, Н.А. Воробьев, В.В. Зверева. - М.: Медицинское информационное агентство, 2008. - 278 с.