



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

### ТИТРОВАНИЕ ВИРУСОВ. РЕШЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЗАДАЧ

#### МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

к практическому занятию

Направление подготовки (специальность)  
36.05.01 Ветеринария

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

Квалификация (степень) выпускника  
Ветеринарный врач

Уфа 2019

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 2019 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.

# ТИТРОВАНИЕ ВИРУСОВ. РЕШЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЗАДАЧ

**Цель занятия:** отработать различные методики титрования вирусов.

**Оборудование и материалы:** тексты задач по титрованию вирусов для каждого студента.

## 1. Общие сведения.

При работе с вирусами постоянно возникает необходимость определения его количества в том или ином материале. Без этого невозможны экспериментальное заражение вирусами живых лабораторных систем, производство вакцин и диагностических препаратов, оценка активности противовирусных вакцин, получение иммунных сывороток и др.

Титр вируса — это количество вирусных частиц в единице объема материала. Однако, количество вируса невозможно выразить в обычно применяемых единицах (объем, масса), поэтому прибегают к измерению в единицах действия или единицах активности (инфекционные единицы). В практике нашли применение два типа единиц количества вируса: 1) инфекционные единицы локальных повреждений, вызываемые вирусами и оцениваемые по единичному эффекту; 2) инфекционные единиц 50%-го действия вирусов на чувствительные живые объекты.

*Определение титра вируса по инфекционным единицам локальных повреждений.* Из локальных повреждений, вызываемы вирусами, известны *бляшки* в зараженных культурах клеток (островки мертвых клеток в слое живых) и *оспины* — некротические узелки на ХАО куриных эмбрионов. В этих случаях говорят о бляшкообразующих единицах (БОЕ) и оспинообразующих единицах (ООЕ). Одна БОЕ равна дозе вируса, способной образовать одну бляшку, а одна ООЕ — одну оспину.

*Определение титра по инфекционным единицам 50%-го действия вирусов на чувствительные живые объекты.* Наиболее универсальным является метод определения титра вируса в единицах 50%-го инфекционного действия. По этому методу за единицу количества вируса принимают такую его дозу, которая способна вызывать инфекционный эффект у 50% зараженных объектов. Она обозначается как ЭД<sub>50</sub> — эффективная 50%-ная доза. Число таких доз вирусов в единице объема материала и есть его титр в данном материале.

Но, в зависимости от вида объекта и характера его поражения, название эффективной дозы может изменяться. Если виру вызывает гибель зараженных лабораторных животных, титр обозначают символом ЛД<sub>50</sub> (летальная доза 50% использованных для заражения животных). Если же вирус вызывает только определенные признаки болезни, титр обозначают ИД<sub>50</sub> (инфекционная доза для 50% зараженных животных). При титровании в куриных эмбрионах и гибели их титр обозначают как ЭЛД<sub>50</sub> (эмбриональная летальная доза); при учете лишь патологоанатомических изменений в курином эмбрионе — ЭИД<sub>50</sub> (эмбрионинфицирующая доза); в случае проявления ЦПД в культуре клеток — ТЦД<sub>50</sub> (тканевая цитопатическая доза).

Титр вируса выражают в количестве инфекционных доз приходящихся на единицу объема. Например,  $10^{3.48}$  ТЦД<sub>50/0.2мл</sub>;  $10^{4.5}$  ЕИД<sub>50/0.2мл</sub>;  $10^{7.45}$  ЛД<sub>50/0.2</sub> мл.

Титрование вирусов по 50%-му инфекционному действию - наиболее универсальный прием, пригодный практически для любого вируса, если подобрать к нему живую систему (тест-объект). Однако, этот метод довольно трудоемкий, длительный и требует статистических расчетов. В настоящем практикуме мы приводим два метода титрования вирусов по 50%-му эффекту.

1. *Метод Рида и Менча* основан на принципе кумуляции (накопления). Предполагается, что если чувствительные объекты погибают после заражения небольшими дозами вируса, они обязательно погибнут и при введении им более концентрированных и наоборот, объекты, остающиеся в живых после введения вирусосодержащего материала в небольшом разведении, не погибнут, если их заразить этим же материалом в максимальном разведении. Принцип кумуляции позволяет искусственно увеличивать число исследуемых объектов и тем самым повысить точность эксперимента.

При определении титра вируса по Риду и Менчу поступают следующим образом. Из исследуемой суспензии готовят ряд последовательных десятикратных разведений вирусосодержащего материала ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , ...,  $10^{-10}$ ). Делают это по двум причинам: а) удобство в расчетах; б) инфекционное действие вируса убывает прямо пропорционально его разведению. Вирусосодержащим материалом в каждом разведении заражают группу чувствительных объектов (в каждой группе не менее 4-6) с целью удобства статистической обработки. За зараженными объектами устанавливают регулярное (не реже одного раза в сутки) наблюдение и фиксируют результат. Изменения в первые 48 ч после заражения трудно признать результатом действия вируса, особенно в высоком разведении, их считают неспецифическими и в расчет не принимают.

2. *Метод Кербера*. Этот метод считается более простым, не требующим расчета кумулятивных данных, пригоден и в случаях положительного эффекта от неспецифических причин. Но для получения достоверных результатов необходимо, чтобы положительные данные были известны в диапазоне от 0 до 100%.

Рассчитаем  $LD_{50}$  для результатов, приведенных в табл.5.

Титры гемагглютинирующих вирусов можно определить РГА .

*Титрование антител*. При титровании антител иммунных сывороток используют два метода:

- 1) определение индекса нейтрализации испытуемой сыворотки ;
- 2) определение максимального разведения испытуемой сыворотки, которое нейтрализует действие стандартной дозы вируса (см. РЗГА, РН и др. реакции).

## 2. Задания.

Определить титр вируса.

**Задача № 1.** Вирус эктромиелии мышей титровали путём внутрибрюшинно-го заражения белых мышей. Использовали 8 разведений вируса. Доза заражения – 0,2 мл. Каждым разведением заражали 4 мышей. К концу опыта от заражения пало мышей в разведении:

$10^{-1} - 4$	$10^{-4} - 3$	$10^{-7} - 0$
$10^{-2} - 4$	$10^{-5} - 1$	$10^{-8} - 0$
$10^{-3} - 3$	$10^{-6} - 1$	

Определите титр вируса.

**Задача № 2.** Вирус болезни ньюкасла титровали на куриных эмбрионах. Использовали 7 разведений вируса. Каждым разведением вируса заражали по 8 эмбрионов в аллантоисную полость в дозе 0,1 мл. К концу опыта от заражения пало эмбрионов в разведении:

$10^{-1} - 8$	$10^{-4} - 5$	$10^{-7} - 0$
$10^{-2} - 8$	$10^{-5} - 2$	
$10^{-3} - 7$	$10^{-6} - 1$	

Определите титр вируса

**Задача № 3.** Вирус осповакцины на культуре клеток титровали путём заражения культуры клеток. Использовали 10 разведений вируса. Каждое разведение вируса вносили в 6 культур куриных фибробластов в дозе 0,1 мл. К концу опыта ЦПД наблюдали в следующем числе культур:

$10^{-1} - 6$	$10^{-4} - 5$	$10^{-7} - 2$
$10^{-2} - 6$	$10^{-5} - 5$	$10^{-8} - 1$
$10^{-3} - 6$	$10^{-6} - 4$	$10^{-9} - 1$
		$10^{-10} - 0$

Определите титр вируса.

**Задача № 4.** Вирус ящура титровали путём интрацеребрального заражения белых мышей. Использовали 7 разведений вируса. Доза заражения – 0,25 мл. Каждым разведением заражали 6 мышей. К концу опыта от заражения пало мышей в разведении:

$10^{-1} - 6$	$10^{-4} - 4$	$10^{-7} - 0$
$10^{-2} - 6$	$10^{-5} - 2$	
$10^{-3} - 5$	$10^{-6} - 1$	

Определите титр вируса.

**Задача № 5.** Вирус инфекционного ларинготрахеита кур титровали на куриных эмбрионах. Использовали 9 разведений вируса. Каждым разведением вируса заражали по 6 эмбрионов на ХАО в дозе 0,2 мл. К концу опыта от заражения пало эмбрионов в разведении:

$10^{-1} - 6$	$10^{-4} - 4$	$10^{-7} - 1$
$10^{-2} - 5$	$10^{-5} - 2$	$10^{-8} - 0$
$10^{-3} - 4$	$10^{-6} - 1$	$10^{-9} - 0$

Определите титр вируса.

**Задача № 6.** Вирус бешенства титровали путём интрацеребрального заражения белых мышей. Использовали 9 разведений вируса. Доза заражения – 0,2 мл. Каждым разведением заражали 10 мышей. К концу опыта от заражения пало мышей в разведении:

$10^{-1} - 10$	$10^{-4} - 8$	$10^{-7} - 2$
$10^{-2} - 10$	$10^{-5} - 7$	$10^{-8} - 1$
$10^{-3} - 9$	$10^{-6} - 4$	$10^{-9} - 0$

Определите титр вируса.

**Задача № 7.** Вирус болезни Марека титровали на куриных эмбрионах. Использовали 6 разведений вируса. Каждым разведением вируса заражали по 4 эмбриона в желток в дозе 0,25 мл. К концу имели изменения окраски желтка эмбрионы в разведении:

$10^{-1} - 4$	$10^{-3} - 3$	$10^{-3} - 0$
$10^{-2} - 4$	$10^{-4} - 1$	$10^{-6} - 0$

Определите титр вируса.

**Задача № 8.** Вирус болезни Ауэски титровали путём внутримышечного заражения кроликов. Использовали 5 разведений вируса. Доза заражения – 0,5 19

мл. Каждым разведением заражали 4-х кроликов. К концу опыта характерную клиническую картину наблюдали у кроликов в разведении:

$10^{-1} - 4$	$10^{-4} - 1$
$10^{-2} - 4$	$10^{-5} - 0$
$10^{-3} - 3$	

Определите титр вируса.

**Задача № 9.** Вирус инфекционного ринотрахеита КРС титровали путём заражения культуры клеток. Использовали 8 разведений вируса. Каждое разведение вируса вносили в 6 матрасов с культурой клеток ПТ-80 в дозе 0,1 мл. К концу опыта ЦПД наблюдали в следующем числе матрасов:

$10^{-1} - 6$	$10^{-4} - 5$	$10^{-7} - 2$
$10^{-2} - 6$	$10^{-5} - 5$	$10^{-8} - 1$
$10^{-3} - 6$	$10^{-6} - 2$	

Определите титр вируса.

**Задача № 10.** Вирус бронхита кур титровали на куриных эмбрионах. Использовали 7 разведений вируса. Каждым разведением вируса заражали по 6 эмбрионов в аллантоисную полость в дозе 0,2 мл. К концу опыта при вскрытии обнаружена карликовость и мумификация зародыша у эмбрионов в разведении:

$10^{-1} - 6$	$10^{-3} - 4$	$10^{-5} - 1$
$10^{-2} - 5$	$10^{-4} - 2$	$10^{-6} - 1$
		$10^{-7} - 0$

Определите титр вируса.

### 3. Контрольные вопросы.

1. Что такое титр вируса?
2. Каковы единицы измерения количества вируса?
3. Каков принцип определения титра вируса в БОЕ и ООЕ?

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Белоусова, Р.В. Вирусология и биотехнология. [Электронный ресурс] / Р.В. Белоусова, Е.И. Ярыгина, И.В. Третьякова, М.С. Калмыкова. - СПб. : Лань, 2016. - 220 с. - Режим доступа: <http://e.lanbook.com/book/88026>

2. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология [Электронный ресурс] : учебник / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, В.И. Плешакова. — СПб. : Лань, 2010. — 482 с. — Режим доступа: [http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1\\_id=569](http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=569)

3. Сюрин, В. Н. Ветеринарная вирусология [Текст] : учебник по спец. «Ветеринария» / В. Н. Сюрин, Р. В. Белоусова, Н. В. Фомина. — 2-е изд., перераб. И доп. — М. : Агропромиздат, 1991.- 431 с.

