PATHOGENICITY OF ISOLATES B-5 VIRUS INFECTION BRONCHITIS OF HENS FOR CHICKENS DIFFERENT AGES

Nemashkalo A.Y., Popova G.A., Postoienko V.O.
Institute of veterinary medicine NAAS, Kyiv, Ukraine

Field isolate B-5 of infectious bronchitis virus of chickens were obtained from broiler farms direction in which respiratory disease was noted in the background poultry vaccinated against IBV. According to preliminary results of RT-PCR revealed the presence of serotypes Masachussets IBV and QX. On the isolate was conducted 3 passages in chicken embryos (CE) in the presence of serum specific to serotype Masachussets to clean the presence of homologous virus serotype and allocation QX serotype. The purpose of these studies is to determine the pathogenicity of field isolates B-5 for chickens 1 week and 1 month old.

Pathogenicity of isolate B-5 IBV determined to chickens 1 week and 1 month old. Chickens infected individual, nasal-ocular method by instillation working dilution 1:10 with virus titer of infectious activity of $10^{7.32}$ in volume of 0.1 cm^3. Control (uninfected) chickens were kept in a separate room with a separate staff. Chickens experimental and control groups examined daily and noted clinical symptoms at rest and after exercise, defined in terms of appearance and duration of display. Research ciliary activity (CA) tracheal epithelium of chickens was performed on 06/04/11 days after infection, immediately after humane slaughter.

In the infected field isolates IBV B-5 chickens of 1 week old first clinical signs appeared on the 4th day after infection as intestinal disorders (diarrhea), and on the 5th day already appeared respiratory clinical signs of disease (wheezing and snorting). At 6–7 days respiratory manifestations were more pronounced, with individual listening noted wheezing expressed in the trachea, 80 % experienced diarrhea chickens. Since the 9th day after infection clinical manifestation of the disease weakened, chickens and recovered at the 11 days all chicks were clinically healthy. Ciliostasis of ciliary epithelium at 4 and 6 days after infection was 38–40 points, to 11 points per day was 5–11, indicating a recovery chickens. Pathological changes in the lungs and kidneys weren`t observed during the course of the disease.

In the infected field isolates IBV B-5 chickens of 1 month old first clinical signs of the disease in them (wheezing and snorting) appeared at the 4th day. Since the 7th day after infection clinical manifestation of the disease weakened, chickens and recovered at the 10 days were clinically healthy. Unlike the previous experiment no intestinal disorders were observed. Ciliostasis of ciliary epithelium on day 4 after infection was 33–29 points, 6 days – 32–28 points, 11 days was 2–4 points. Pathological changes in the lungs and kidneys weren`t observed during the course of the disease. Only 6 days after infection observed nephritis in a chicken.

Based on the results concluded that the field isolate B-5 IBV is pathogenic for chickens 1-week and 1-month old, causing them when nasally-ocular infection of respiratory disease, ciliostasis of the ciliary epithelium of the trachea.

Keywords: infectious bronchitis of hens, infectious bronchitis virus, ciliary activity, ciliostasis, pathogenicity.

УДК 619.616.98:579.843

ПАСПОРТИЗАЦІЯ МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ *CAMPYLOBACTER FETUS*

Обуховська О.В., Драгуть С.С., Куценко В.А., Калініченко Т.В.
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: olgaobukhovska@gmail.com

Кампілобактеріоз – небезпечне захворювання сільськогосподарських тварин, що характеризується ураженням органів репродуктивної системи та шлунково-кишкового тракту. Контаміновані збудником продукти тваринництва можуть слугувати джерелом інфекції для людини і спричиняти токсикоінфекції із складним перебігом. Вітчизняних препаратів для прижиттєвої діагностики цього захворювання немає.

З метою визначення перспективних виробничих штамів було проведено серію дослідів з вивчення морфо-тинкторіальних, біохімічних, культуральних та антигенних властивостей музейних культур кампілобактерій.

За результатами досліджень було визначено 2 виробничих штами (Campylobacter fetus subsp. fetus 9св та Campylobacter fetus subsp. venerealis 6913), які мають типові родові та видові характеристики.

Також з 4-х напіврідких та щільних поживних середовищ відібрано 2, які можуть бути рекомендовані в якості елективних для підтримки виробничих штамів кампілобактерій (НРМПА із вмістом 0,2 % та 0,25 % агарози).

На заключному етапі досліджень проведено паспортизацію виробничих штамів кампілобактерій. Внутрішні паспорти ННЦ «ІЕКВМ» містять інформацію щодо походження штамів, біологічних характеристик, умов зберігання штамів та галузі їх використання.

Ключові слова: Campylobacter fetus, виробничі штами, паспортизація

Кампілобактеріоз широко розповсюджений у світі та обумовлює відповідно до сезону року й особливостей регіону до 15 % усіх гострих кишкових захворювань людини. Спорадичні випадки та спалахи кампілобактеріозної інфекції пов'язані із вживанням у їжу контамінованих продуктів [4]. Найбільш суттєвими природними резервуарами збудників кампілобактеріозу є сільськогосподарські тварини (рогата худоба та свині). При цьому встановлена провідна роль в інфекційній патології людини таких видів кампілобактерій, як *C. jejuni, C. coli, C. fetus* [3, 7]. Наслідки спалахів кампілобактеріозу або носійства цього збудника (які призводять до втрати репродуктивних властивостей у тварин), а також заходи щодо боротьби з хворобою, які включають застосування закордонних діагностичних та профілактичних препаратів, призводять до значних економічних збитків у сільському господарстві [5, 6].

На цій підставі актуальною проблемою фахівців ветеринарної медицини є вивчення біологічних властивостей кампілобактерій та визначення виробничих штамів з метою створення вітчизняних діагностичних імунобіологічних препаратів [1, 2].

Матеріали та методи. Морфо-тинкторіальні властивості кампілобактерій вивчали за характером росту на твердих, напіврідких поживних середовищах, а також шляхом мікроскопії мазків, пофарбованих за Грамом або розведеним 1:10 фуксином Циля.

Культурально-біохімічні властивості штамів були вивчені у процесі культивування на напіврідкому агарі (НРМПА) з додаванням 1 % гліцину, 4 % жовчі ВРХ, 3,5 % натрію хлориду, 0,02 % цистину; середовищі Ресселя. Також була вивчена спроможність штамів рости за різних температур (від 15 ºС до 40 ºС) ºС і утворювати H_2S та індол; чутливість до налідіксової кислоти і цефалотину; наявність каталази та ферментів для гідролізу індоксилацетату.

Антигенні властивості штамів були вивчені в РА на склі із виробничими специфічними кампілобактеріозними сироватками. При цьому на поверхню предметного скельця наносили краплю стерильного фізрозчину, одну бакпетлю живої культури кампілобактерій знімали з поверхні МППА та вносили в краплю фізрозчину, додавали краплю відповідної сироватки та обережно змішували. Облік пластинчатої реакції аглютинації ураховували за кімнатної температури (20–25 ºС) візуально на темному фоні або під стереоскопом МБС-2, обережно коливаючи скельце впродовж 3 хвилин. Ступінь активності аглютинації оцінювали в хрестах:

++++ (4 хрести) – повне просвітлення суспензії з формуванням чіткого аглютинату – позитивна реакція;

+++ (3 хрести) – неповне просвітлення рідини з формуванням чіткого аглютинату – позитивна реакція;

++ (2 хрести) – неповне просвітлення рідини з формуванням мілкого аглютинату – позитивна реакція;

+ (1 хрест) – рідина без просвітлення з формуванням малопомітного аглютинату – сумнівна реакція;

- (мінус) – суспензія гомогенно каламутна – негативна реакція.

Стабільність штамів підтримували шляхом вирощування в м'ясо-печінковому пептонному напіврідкому (0,15–0,2 %) агарі (НРМППА) з 0,02 % цистіну та клонування на щільному м'ясо-печінковому пептонному агарі (МППА) із 0,02 % цистіну, 0,5 % автолізату пекарських дріжджів.

На поживних середовищах кампілобактерії вирощували впродовж 2–3 діб за (37±1) ºС за мікроаерофільних умов (у присутності 15 % CO_2).

Результати досліджень. З метою визначення перспективних виробничих штамів було проведено вивчення властивостей 4-х музейних культур кампілобактерій:

- *Campylobacter fetus subsp. fetus* 9св;
- *Campylobacter fetus subsp. venerealis* 6913;
- *Campylobacter fetus subsp. venerealis* 3-1943;
- *Campylobacter fetus subsp. venerealis* Росія, які зберігалися в ліофілізованому стані впродовж тривалих строків (34–36 роки) за температури (2–4) °С (табл. 1).

Таблиця 1 – Біохімічні та культуральні властивості музейних культур кампілобактерій

№ з/п	Тести	*C. fetus subsp. fetus* **9св**	*C. fetus subsp. venerialis* **6913**	*C. fetus subsp. venerialis* **3-1943**	*C. fetus subsp. venerialis* **Росія**
	Каталаза	+	+	+	+
	Ріст при:				
	15 °С	-	-	-	-
	25 °С	+	+	+	+
	37 °С	+	+	+	+
	42 °С	+	+/-	+/-	-
	Ріст на НРМПА з 1 % гліцину	+	+	-	-
	Ріст на НРМПА з 1 % жовчі	+	+	+	+
	Ріст на НРМПА з 3,2 % цистеїну	+	+	+	+
	Ріст на НРМПА з 1,5 % NaCl	+	+	-	-
	Чутливість до:				
	налідіксової к-ти	-	-	-	-
	цефалотину	+	+	+	+
	Утворення H_2S	+	+	+	+

	Утворення індолу	-	-	-	-
	Гідроліз індоксилацетату	-	-	-	-
	Ріст на середовищі Ресселя	-	-	-	-
Примітки: "+" – наявність росту; "-" – відсутність росту; "+/-" – незначний ріст					

Морфо-тинкторіальні властивості були характерними для роду *Campylobacter*, а саме: грамнегативні тонкі, віброїдні клітини S-образної форми чи у вигляді коми, «крил чайки», з одним або багатьма витками спіралей діаметром 0,2–0,5 мкм і довжиною до 8 мкм.

Усі культури росли за концентрації вуглекислого газу 15 % за температури (37±1) ºС. В аеробних умовах росту не спостерігали.

Усі штами росли за температури 25 ºС та 37 ºС; не росли за температури 15 ºС. Також усі штами були не чутливі до наявності в середовищі 1 % жовчі; 3,2 % цистеїну та цефалотину і чутливі до налідіксової кислоти. Утворювали H_2S та не утворювали індол; не гідролізували індол ацетат і не росли на середовищі Ресселя.

Штам *C. fetus subsp. fetus* 9св на відміну від інших штамів ріс за температури 42 ºС та на НРМПА із 1 % гліцину та 1,5 % NaCl. Штам *C. fetus subsp. venerialis* 6913 проявляв незначний ріст за температури 42 ºС та інтенсивний ріст на НРМПА із 1 % гліцину та 1,5 % NaCl. Штам *C. fetus subsp. venerialis* 3-1943 показував незначний ріст за температури 42 ºС та не культивувався на НРМПА із 1 % гліцину та 1,5 % NaCl. Штам *C. fetus subsp. venerialis* Росія не ріс за температури 42 ºС; на НРМПА із 1 % гліцину та 1,5 % NaCl. Таким чином, типові властивості мали штами *C. fetus subsp. fetus* 9св та *C. fetus ssp. venerealis* 6913.

Ураховуючи той факт, що для підтримки кампілобактерій в нативному стані необхідно пересівати їх кожні 7–10 діб нами були проведені дослідження з метою визначення найбільш ефективного поживного середовища для збереження виробничих штамів. Для цього було проведено порівняльне вивчення ростових властивостей штамів кампілобактерій за пасажування їх на різних поживних середовищах (табл. 2).

Таблиця 2 – Ростові властивості кампілобактерій

Поживне середовище Назва штаму	**НРМПА із вмістом 0,2 % агарози**	**НРМПА із вмістом 0,25 % агарози**	**НРМПА із пептоном і глюкозою**	**МПА із казеїном, автолізатом пекарських дріжджів і цистином**
C. fetus. subsp. venerialis 6913	Інтенсивний ріст у вигляді кільця на 1-2 мм від поверхні середовища	Інтенсивний ріст у вигляді кільця на поверхні середовища	Дуже слабкий ріст у вигляді тоненького кільця на поверхні середовища	Слабкий ріст у вигляді напівпрозорого нальоту на нижній частині агару
C. fetus. subsp. venerialis «Росія»	Слабкий ріст у вигляді кільця на 1-2 мм від поверхні середовища	Слабкий ріст у вигляді кільця на поверхні середовища	Слабкий ріст у вигляді тоненького кільця на поверхні середовища	Слабкий ріст у вигляді напівпрозорого нальоту на нижній частині агару
C. fetus. subsp. venerialis 3-1943	Слабкий ріст у вигляді кільця на 1-2 мм від поверхні середовища	Слабкий ріст у вигляді кільця на поверхні середовища	Дуже слабкий ріст у вигляді тоненького кільця на поверхні середовища	Слабкий ріст у вигляді напівпрозорого нальоту на нижній частині агару
C. fetus. subsp. fetus 9 св	Інтенсивний ріст у вигляді кільця на 1-2 мм від поверхні середовища	Інтенсивний ріст у вигляді кільця на поверхні середовища	Слабкий ріст у вигляді тоненького кільця на поверхні середовища	Слабкий ріст у вигляді напівпрозорого нальоту на нижній частині агару

Як видно з таблиці 2, штами *C. fetus. subsp. fetus* 9 св та *C. fetus. subsp. venerialis* Росія показали найбільш інтенсивний ріст на НРМПА із вмістом 0,2 % та 0,25 % агарози, тому саме ці середовища доцільно застосовувати для підтримки виробничих штамів. Штами *C. fetus. subsp. venerialis* 3-1943 та *C. fetus. subsp. venerialis* 6913 давали незначне накопичення бактеріальної маси на усіх поживних середовищах. Усі чотири штами (*C. fetus. subsp. venerialis* 6913, *C. fetus. subsp. venerialis* «Росія», *C. fetus. subsp. venerialis* 3-1943, *C. fetus. subsp. fetus* 9 св) дають слабкий ріст на НРМПА із пептоном і глюкозою.

Ураховуючи той факт, що два штами володіли типовими біохімічними властивостями та мали високі ростові показники, надалі було проведено вивчення їх антигенних властивостей із застосуванням виробничих гомо- та гетерологічних сироваток (табл. 3).

Таблиця 3 – Антигенні властивості штамів кампілобактерій

Штами	**Контрольні сироватки**		
	C. fetus subsp. venerialis	*C. fetus subsp. fetus*	**Негативна**
C. fetus subsp. venerealis 6913	#	-	-
C. fetus subsp. fetus 9св	-	#	-
Примітки: # – позитивна реакція аглютинації; "-" – негативна реакція аглютинації.			

Як видно з матеріалів таблиці 3, штами *C. fetus subsp. venerealis* 6913 та *C. fetus subsp. fetus* 9св мали типові антигенні властивості, а саме, реагували на # із гомологічними сироватками та не реагували із гетерологічними та негативною сироватками. Активність антигенів була високою; специфічність їх була підтверджена відсутністю реакцій із негативною та гетерологічною сироватками.

Після серії дослідів два штами (*C. fetus ssp. venerealis* 6913 та *C. fetus ssp. fetus* 9св) були визначені як перспективні виробничі та паспортизовані. Паспортизація здійснювалась за наступними пунктами:

1. Видова назва мікроорганізму
2. Позначення штаму
3. Родовід штаму
4. Спосіб одержання штаму
5. Хто і де (організація) ідентифікував штам
6. Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму
7. Відомості про патогенність штаму
8. Антигенні (серологічні) властивості штаму
9. Дата, номер останнього пасажу на чутливій системі
10. Генетичні особливості штаму (ауксотрофність, резистентність до антибіотиків, фагів тощо)
11. Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму
12. Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму
13. Галузь використання штаму
14. Відомості про депозитора

З цією метою в ННЦ «ІЕКВМ» були розроблені та затверджені у встановленому порядку внутрішні паспорти (*Campylobacter fetus subsp. venerealis* 6913 паспорт № 226; *Campylobacter fetus subsp. fetus* 9св ННЦ «ІЕКВМ» паспорт № 225).

Висновки. У процесі вивчення морфо-тинкторіальних, культуральних, біохімічних та антигенних властивостей 4-х музейних штамів *Campylobacter* були визначені перспективні виробничі штами (*Campylobacter fetus subsp. fetus* 9св та *Campylobacter fetus subsp. venerealis* 6913), які відповідають типовим родовим та видовим характеристикам.

В якості елективних поживних середовищ для підтримки виробничих штамів кампілобактерій рекомендовані НРМПА із вмістом 0,2 % та 0,25 % агарози.

Проведено паспортизацію виробничих штамів кампілобактерій. Внутрішні паспорти ННЦ «ІЕКВМ» утримують інформацію щодо походження штамів, біологічних характеристик, умов зберігання штамів та галузі їх використання.

Перспективи подальших досліджень. Паспортизовані виробничі штами кампілобактерій будуть застосовані в дослідах щодо виготовлення компонентів тест-систем для серологічної діагностики генітальних кампілобактеріозів рогатої худоби.

Список літератури

1. Бабкин, А.Ф. Изучение выживаемости кампилобактерий, хранящихся в лиофильном состоянии на питательных средах / А.Ф. Бабкин, Н.И. Галищев, Д.С. Новаковский // Вет. медицина: міжвід. тематич. наук. зб.– Х., 2002. – Вип. 80. – С. 42-47.
2. Бабкин, А.Ф. Культурально-биохимические свойства кампилобактеров и получение моноспецифических сывороток / А.Ф. Бабкин, Н.И. Галищев, Д.С. Новаковский // Вет. медицина: міжвід. тематич. наук. зб. – Х., 2003. – Вип. 81. – С.25-33.
3. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques / G.D. Mshelia [et al.] // Reprod. Domest. Anim. – 2010. – Vol. 45, № 5. – P. 221-230.
4. Global detection and identification of Campylobacter fetus subsp. venerealis / M.A. van Bergen, S. Linnane , J.P. van Putten, J.A. Wagenaar // Rev. Sci. Tech. – 2005 –.Vol. 24, № 3. – P. 1017-1026.
5. Prevalence of bovine genital campylobacteriosis and trichomonosis of bulls in northern Nigeria / H.M. Mai, P.C. Irons, J. Kabir, P.N. Thompson // Acta Vet. Scand. – 2013. – Vol. 9. – P. 55-56.
6. Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina) / L. Molina [et al.] // Prev. Vet. Med. – 2013. Vol. 110, № 3-4. – P. 388-394.
7. Swai, E.S. Prevalence of genital campylobacteriosis and trichomonosis in crossbred breeding bulls kept on zero-grazed smallholder dairy farms in the Tanga region of Tanzania / E.S. Swai, J. Hulsebosch, W. Van der HeijdenJ // J.S. Afr. Vet. Assoc. – 2005. – Vol. 76, № 4. – P. 224-227.

CAMPYLOBACTER FETUS MUSEUM STRAINS CERTIFICATION

Obukhovska O.V., Dragut S.S., Kutzenko V.A., Kalinichenko T.V.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov, Ukraine

Campylobacteriosis – dangerous disease of agricultural animals, which is characterized by lesions of the reproductive system and the gastrointestinal tract. Contaminated livestock products can be a source of infection for humans and cause toxicoinfection with severe disease. Domestic preparations for the in vivo diagnosis of the disease is not present.

In order to identify of promising industrial strains carried out a series of experiments for study the morphological, tinctorial, biochemical, cultural and antigenic properties of the museum Campylobacter cultures.

According to the research were selected 2 industrial strains (Campylobacter fetus subsp. Fetus 9sv and Campylobacter fetus subsp. venerealis 6913), which showed the typical generic and specific characteristics.

Also from 4 semi-solid and solid nutrient mediums were selected 2 ones, that can be recommended as elective for maintaining of Campylobacter industrial strains (semi-solid MPA with 0.2 % and 0.25 % agarose).

At the final stage of the research was conducted certification of Campylobacter industrial strains. Internal passports of NSC «IEKVM» contain information about the origin of the strains, biological characteristics, storage conditions, their useing.

Keywords: Campylobacter fetus, industrial strains, certification.