

4. Hesse, R, Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field [Text] / R.Hesse, M.Kerrigan, RR. Rowland // Virus Res.-2008.- Vol. 132.- P.201-207
5. Association of concurrent porcine circovirus (PCV) 2a and 2b infection with PCV associated disease in vaccinated pigs [Text] / P.F.Gerber [et al.] // Res Vet Sci. – 2013.- Vol. 95.- P.775-781.
6. Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs [Text] / J.C. Harding, J.A. Ellis, K.A. McIntosh, S.Krakovka // Vet Microbiol. - 2010.-Vol. 145. – P.209-219.
7. Герілович, А.П. Біоінформативна розробка праймерів для типування цирковірусів свиней II типу методом полімеразної ланцюгової реакції. [Текст] / А.П. Герілович, Н.Г. Рудова // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. - 2012.- № 96.- С. 87-89.
8. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях [Текст] / під ред. Б. Т. Стегній. // – Х.: ННЦ «ІЕКВМ», 2010. - 258 с.
9. He, D, Development of PCR for the Identification of Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) Genotype PCV-2a and PCV-2b [Text] / Dongsheng He [et al.] // Journal of Animal and Veterinary Advance.-2011.- V. 10.- Issue: 18. - P. 2398-2401

PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT AND USE OF PRIMER SYSTEMS FOR GENOTYPING PORCINE CIRCOVIRUSES TYPE II BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Rudova N.G.

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

Porcine circovirus infection is widespread throughout the world where the pig-breeding is main branch of livestock. The etiological agent of porcine circovirus infection is a DNA virus, which is related to the Circoviridae family, Circovirus genus. PCV has an expressed tropism for lymph cells and characterized by a variety clinical manifestations. Losses from this disease consist of the mass (30 %) of young decease, decreased feed conversion, reproductive system disorders in adult animals (abortion, stillbirth, infertility). Today it is the main problem in the industrial pig farming.

At this point in the literature described 3 genogroup of circoviruses, which existence is due of the continuous virus evolution. Simultaneous infection of animals with multiple PCV-II genotypes may increase the intensity of viral replication and development of the more severe clinical manifestations of the PCV-associated diseases.

Monitoring of the genotypes prevalence among infected animals is carried out in many countries where pig farming is one of the most developed livestock industries. Such investigations in Ukraine is an important, but still is not the solving problem.

The article presents data of the prospects for the primer systems development and application for genotyping porcine circovirus type II by polymerase chain reaction. Work performed using bioinformatics and molecular genetic research methods. The analysis of the literature data and a series of studies aimed at optimizing PCR protocols with previously developed, theoretically proven and synthesized primer systems held. It was found that the classical PCR is unsuitable to use for genotyping PCV-II due to its low specificity. So amplification methods using PCR standard format can't fully replace the classic approaches to genotyping.

Keywords: porcine circovirus type II, molecular diagnostics, genotyping, primer systems.

УДК 619:616.98:578.831.11:616-084

ВИДІЛЕННЯ ТА ВИВЧЕННЯ ОСНОВНИХ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕПІЗООТИЧНОГО ВІРУСУ ХВОРОБИ ГАМБОРО «ХАРКІВ-2012»

**Стегній Б.Т., Рула О.М., Музика Д.В., Стегній А.Б.,
Потрясаєва О.О., Ткаченко С.В., Кошелєв В.В.**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: alex.ru75@inbox.ru*

У статті наведені дані лабораторних досліджень (серологічні, вірусологічні, молекулярно-генетичні) біологічного матеріалу (кров, внутрішні органи) молодняка птиці з неблагополучного птахогосподарства Харківської області до збудника інфекційної бурсальної хвороби (хвороба Гамборо). У результаті проведеної роботи був виділений новий епізоотичний вірус інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ) «Харків-2012» і встановлена динаміка приросту антитіл до даного збудника серед поголів'я птиці.

Ключові слова: епізоотична ситуація, курчата, імунodefіцит, імуносупресія, інфекційна бурсальна хвороба, хвороба Гамборо.

Резистентність птиці до інфекційних захворювань залежить від функціонального стану органів імунної системи та різних імунodeпресивних факторів, що постійно діють на організм [1, 2]. Дія різних чинників спричиняє виснаження імунітету. Серед збудників інфекційних хвороб птиці імунну систему найбільш виражено уражає вірус інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ) або хвороба Гамборо. Він проявляє тропізм до лімфоїдних клітин, викликає їх руйнування і блокує імунну відповідь [5]. Ураження системи імунітету спричиняє стан імунodefіциту і знижує резистентність організму птиці до дії збудників інших інфекційних

хвороб. На сьогоднішній день збудник хвороби Гамборо широко розповсюджений на всіх континентах світу, що наносить значних економічних збитків [3, 4]. Слід відмітити, що вірус інфекційної бурсальної хвороби вражає в більшості випадків молодняк курей, а у дорослої птиці він не викликає гострої інфекції та захворювання, але може вплинути на стійкість до інших інфекцій, продуктивність та конверсію корму.

Вакцинопрофілактика – це єдине вірне і надійне рішення у боротьбі з даною інфекцією. Головною умовою ефективною профілактики ІБХ є відповідність антигенних властивостей польових ізолятів збудника і штамів, які використовуються для виготовлення вакцин [5, 6].

Мета роботи: виділити новий епізоотичний вірус ІБХ та дослідити його основні біологічні властивості та динаміку приросту антитіл у інфікованої птиці в умовах господарства.

Матеріали та методи. Для проведення серологічних і вірусологічних досліджень використовували біологічний матеріал (сироватка крові, внутрішні органи) від молодняку птиці 105, 155 та 205-добового віку кросу «Хай Лайн коричневий» (ХЛК), яка утримувалась на одній із птахофабрик Харківської області. Серологічні дослідження сироваток крові щодо виявлення антитіл до збудника НХ проводили в РЗГА, а до збудників ІБХ та ІБК імуноферментним методом (ІФА) з використанням комерційних наборів тест-системи виробництва IDEXX (США).

Вірусологічні дослідження проводили на 9–11-добових курячих ембріонах, що розвиваються. Для цього на ФСБ (рН7,2±0,2) з антибіотиком готували 10 % суспензію гомогенату патматеріалу (бурса, селезінка). Інфікування КЕ проводили в хоріоналантаїсну порожнину в об'ємі 0,2 см³. Заражені ембріони поміщали в термостат за температури 37,5 °С та двічі на добу овоскопували протягом 216 годин. Ембріони, які гинули в перші 48 годин після зараження не враховували (неспецифічна загибель). Після зазначеного строку інкубування ембріони охолоджували за температури 4 °С впродовж 24–36 годин, потім проводили розтин та досліджували на наявність характерних змін. При їх відсутності виконували наступні пасажі з використанням для інфікування суспензію із ХАО, ембріонів та екстраембріональної рідини.

Заключну ідентифікацію виділеного ізоляту проводили в ПЛР. Ізоляцію сумарних нуклеїнових кислот для проведення молекулярно-генетичних досліджень проводили за допомогою наборів для екстракції ДНК та РНК виробництва фірми АпліСенс (м. Москва, Російська Федерація). Зворотню транскрипцію проводили за допомогою набору «Реверса Л» виробництва фірми АпліСенс (м. Москва, Російська Федерація). Реакцію ампліфікації проводили за допомогою базових наборів виробництва фірми АпліСенс (м. Москва, Російська Федерація) та системи праймерів GD_4/5 на першому етапі та GD_1/6 – на другому.

Визначення біологічної активності виділеного епізоотичного вірусу проводили шляхом титрування його на 9-добових КЕ. Для цього готували десятикратні розведення вірусу від 10⁻¹ до 10⁻⁸ на ФСБ з додавання антибіотиків. Витримували за кімнатної температури впродовж 30 хв. та після цього використовували для інфікування КЕ. На кожне розведення брали 4 ембріони, а інкубували їх впродовж 120 годин. Після закінчення вказаного строку КЕ охолоджували при температурі 2–8 °С впродовж 18 годин та проводили розтин. Титр біологічної активності виражали в ЕІД₅₀, а розрахунок проводили по Ріду та Менчу.

Усі серологічні та вірусологічні дослідження проводили за загальноприйнятими методиками, рекомендованими МЕБ [6].

Результати дослідження. У 2012 році при проведенні епізоотологічного моніторингу з однієї птахофабрики в Харківській області було доставлено сироватку крові, живі та трупи молодняка птиці 105-добового віку кросу «Хай Лайн коричневий». На момент обстеження у пташнику утримувалося близько 3-х тисяч птиці. Клінічних ознак захворювання не відмічали, крім підвищеного споживання питної води. Також відмічали наявність посліду світло-коричневого кольору з домішками слизу. При проведенні патологоанатомічного розтину вимушено забитої та загиблої птиці було виявлено смугасті крововиливи в м'язах стегна, атрофія бурси та накладання фібрину в її порожнині, крапчасті крововиливи на межі залозистого та м'язового шлунків.

При проведенні серологічних досліджень в РЗГА та ІФА крові даної птиці щодо наявності антитіл до збудників ньюкаслської хвороби та інфекційного бронхіту курей було встановлено, що напруженість імунітету до означених збудників становила 80 та 100 % відповідно. Високі титри та значні коливання їх не відмічено. Зовсім інша ситуація відмічалася щодо хвороби Гамборо. Серопозитивною виявилось 64 % дослідженої птиці з середнім титром антитіл 915 ± 863 та коефіцієнтом варіації (CV) титрів антитіл – 94,3 %, що свідчило про значні коливання титрів антитіл.

З метою встановлення динаміки зростання титрів антитіл було проведено повторні дослідження крові даної птиці через 50 та 70 діб. Результати проведеної роботи наведені в нижчеподаній таблиці.

Таблиця – Загальні результати ІФА щодо наявності антитіл до збудника ІБХ в сироватках крові птиці

Вік птиці	Наявність антитіл до ІБХ			
	Lg T	середній титр антитіл	кількість позитивних проб	коефіцієнт варіації (CV) титрів антитіл
105 діб (n = 25)	2,39 + 1,31	915 + 863	64 %	CV = 94,3 %
Через 50 діб (n = 25)	2,99 + 1,02	3378 + 511	76 %	CV = 100,8 %
Через 70 діб (n = 25)	3,70 + 0,266	5824 + 2699	100 %	CV = 46,3 %

Аналізуючи результати трьох послідовних серологічних досліджень крові молодняка птиці та в подальшому курей-несучок щодо інфекційної бурсальної хвороби виявлено поступове зростання кількості позитивних проб (від 64 до 100 %) упродовж 3-х місяців, а також середніх титрів антитіл (від 915 ± 863 до 5824 ± 2699). Також було виявлено приріст рівня антитіл (з 2455 до 12779 та 10853) та неоднорідність, як при першому дослідженні (CV = 94,3 %) так і послідовних (другий – 100 %, третій – 46,3 %).

Так, результати серологічних досліджень, за відсутності вакцинації птиці проти вірусу інфекційного бурситу, свідчили про можливу наявність циркуляції в пташнику даного вірусу. Для остаточного з'ясування епізоотичної ситуації були проведені вірусологічні дослідження патологічного матеріалу від птиці з цього пташника.

Вірусологічні дослідження проводили на 9–11-добових курячих ембріонах, що розвиваються. Усього було проведено 5 пасажів з яких 3 на ВПФ курячих ембріонах та 2 на умовно ВПФ-курячих ембріонах. Перші патологоанатомічні зміни на КЕ та їх загибель були виявлені на четвертому пасажі. На п'ятому пасажі через 120 год. після інфікування спостерігали масову загибель КЕ. При розтині інфікованих КЕ були виявлені наступні зміни: затримка росту та розвитку, гіперемія та крововиливи на шкірі в ділянці голови та крил, крапчасті крововиливи в м'язах грудо-черевної порожнини, печінка та нирки збільшені та наповнені кров'ю, підшкірний набряк на ділянці нижньої частини тулуба. Все це свідчило про виділення з патологічного матеріалу від хворих курей вірусного інфекційного агенту. Відсутність бактеріальної контамінації була підтверджена бактеріологічними дослідженнями екстраембріональної рідини.

Заключну ідентифікацію виділеного ізоляту проводили в ПЛР. У результаті проведеного дослідження встановлено належність виділеного ізоляту до вірусу інфекційної бурсальної хвороби. Після виділення та ідентифікації наступним етапом наших досліджень було вивчення біологічних властивостей цього польового ізоляту на КЕ.

Визначення біологічної активності виділеного епізоотичного вірусу проводили шляхом титрування його на 9-добових КЕ. Титр біологічної активності становила $4,75 \text{ Ig EID}_{50}/\text{cm}^3$.

Висновки. 1. Ураховуючи анамнестичні дані: відсутність профілактичного щеплення птиці проти збудника хвороби Гамборо інактивованою вакциною при пересадці з зони вирощування на зону продуктивності; наявність патологічних змін при розтині птиці; приріст та висока строкатість антитіл до даного збудника; патологоанатомічні зміни на КЕ при проведенні вірусологічних досліджень позитивні молекулярно-генетичні дослідження свідчили про циркуляцію польового вірусу хвороби Гамборо серед поголів'я птиці птахофабрики.

2. При серологічних дослідженнях крові птиці впродовж 3-х місяців виявили поступове зростання кількості позитивних проб до ІБХ (від 64 % до 100 %), а також середніх титрів антитіл (від 915 ± 863 до 5824 ± 2699). Також було виявлено приріст рівня антитіл (з 2455 до 12779 та 10853) та їх неоднорідність як при першому дослідженні ($CV = 94,3 \%$), так і послідовних (другий – 100 %, третій – 46,3 %).

3. При проведенні вірусологічних досліджень біологічного матеріалу від молодняка птиці був виділений ізолят ІБХ якому було присвоєно назву «Харків – 2012». Досліджено його біологічну активність ($4,75 \text{ Ig EID}_{50}/\text{cm}^3$).

Список літератури

1. Алиев, А.С. Инфекционная бурсальная болезнь // С.-Петербург, 2010.- 250 с.
2. Бакулин, В. А. Болезни птиц [текст] // СПб., 2006.- 762 с.
3. Калнек, Б.У. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц [текст] / Б.У. Калнек, Х. Джон Барнс, Чарльз У. Биерд, И.М. Сэйф // М.: Аквариум, 2003. - 1231 с.
4. Рула, О.М. Шляхи забезпечення епізоотичного благополуччя птахогосподарств України щодо інфекційної бурсальної хвороби птахогосподарств України щодо інфекційної бурсальної хвороби (хвороба Гамборо) [текст]// Ветеринарна медицина: між. темат. зб., Харків.- 2012.- Вип. 96.- С. 230 – 232.
5. Стегній Б.Т. Науковий супровід ветеринарних проблем птахівництва України [текст] / Б.Т. Стегній, Д.В. Музика // Ветеринарна медицина України.- 2013.- №10.- С. 19-22.
6. Сюрин, В.М. Методи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин [текст] / В.М. Сюрин та ін. // – М. : Высш. школа, 1986.-С.82-140.

ISOLATION AND STUDYING OF MAIN BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF EPIZOOTIC GUMBORO DISEASE VIRUS “KHARKIV-2012”

Stegniy B.T., Rula O.M., Muzyka D.V., Stegnyy A.B., Potrjasajeva E.A., Tkachenko S.V., Koshelev V.V.
National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

The passage presents research data (serologic, virologic, molecular genetic) of biological material (blood, internal organs) of young poultry from farm in Kharkiv region infected by infectious bursal disease (Gumboro disease). As a result of work carried out a new epizootic virus of infectious bursal disease (IBD) “Kharkiv-2012” has been isolated and growth dynamics of antibody level against this disease among poultry herd has been established.

Materials and methods. Biological material from young poultry which had been kept on a farm in Kharkiv region was used for serological and virological and serological studies. Serological studies of blood sera samples for determination of antibody availability to ND pathogen have been carried out with HI test and to IBD and IBV – with ELISA using commercial sets manufactured by IDEXX (USA).

Results. Using HI and ELISA tests of blood sera to determine the presence of antibodies to ND and IBV it has been revealed that immunity to mentioned pathogens has reached 80 and 100 % respectively. As for Gumboro disease, 64 % of poultry were serologically positive and substantial fluctuations in antibody titers had been observed. In repeated studies of blood 50 and 70 days later, gradual increase in the number of positive samples has been found (from 64 to 100 %). This indicates the absence of vaccination of poultry against IBD, a circulation of this virus in poultry house is possible. Virological studies had been performed using 9–11-day-old chicken embryos. In fifth passage 120 hours after infection mass mortality of embryos had been observed.

Conclusions. An IBD isolate has been isolated during the research and it was called “Kharkiv-2012”. It's biological characteristic have been studied ($4,75 \text{ Ig EID}_{50}$ per cubic centimeter).

Keywords: epizootic situation, chickens, immunodeficiency, vaccination, immunosuppression, infectious bursal disease, Gumboro disease.