

Materials and methods. Epizootical monitoring of avian pneumovirus among fowl in 17 industrial and homestead poultry farms of Ukraine had been conducted by the laboratory of avian diseases of NSC «IECVM» during 2015-2016. Blood samples (589 items) have been collected in farms from chickens and turkeys of different age groups and sent to the laboratory of NCS "IECVM" for further studies to determine the presence of antibodies to avian pneumovirus

Studies have been carried out using commercial diagnostic avian pneumovirus antibody test kit manufactured by IDEXX (USA).

Blood sampling has been conducted by the common technique.

Conclusions. 1. The analysis of literary sources shows wide spread of avian pneumovirus in the world significant economic damage made to poultry farming, especially in association with bacterial infections.

2 Epizootical monitoring of avian pneumovirus has been conducted and information about the presence of this disease in Ukraine has been received, namely in Kharkiv, Chernovtsy, Khmelnytsky, Zaporizhia, Donetsk and Kiev regions. 51% out of 589 samples of blood sera collected from chickens and turkeys in industrial and homestead poultry farms were positive (average titer 5238).

3. The work carried out has confirmed the necessity of domestic diagnostics creation, namely avian pneumovirus antibody ELISA test kit.

Keywords: *avian pneumovirus, infectious rhinotracheitis, swollen head syndrom, blood sera*

УДК 619:578.823.083.2:636.52/.58

ЗДАТНІСТЬ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОЇ БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ ДО КУЛЬТИВУВАННЯ У РІЗНИХ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ

Стегній Б. Т., Потрясаєва О. О., Музика Д. В., Рула О. М.

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua*

У статті наведені дані щодо вибору оптимальної системи культивування вірусу інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ). Досліджуваний штам вірусу інфекційної бурсальної хвороби адаптований до культивування на первинно – трипсинізованій культурі клітин фібробластів ембріонів курей.

Ключові слова: *вірус ІБХ, культивування, культура клітин, інфекційна активність*

Інфекційна бурсальна хвороба відноситься до найбільш небезпечних і розповсюджених інфекційних хвороб промислової птиці. Захворювання наносить значні економічні збитки птахівничій галузі, які складаються як з прямих витрат (загибель, зниження продуктивності, імуносупресія), так і витрат на проведення додаткових ветеринарно-санітарних заходів у разі його виникнення.

На сьогоднішній день у птахогосподарствах України, за результатами досліджень діагностичного матеріалу методом ІФА, у птиці спостерігається достатньо напружений імунітет, але виявлення в деяких випадках «строкатості» титрів антитіл може свідчити про можливу циркуляцію польових вірусів [4]. У зв'язку з цим великого значення набуває постійний епізоотологічний моніторинг ізолятів збудника ІБХ у птахівничих господарствах України. Це дасть змогу вивчати еволюцію вірусу ІБХ у межах регіону чи конкретного господарства та прогнозувати епізоотичний стан галузі.

Найбільш ефективним напрямом боротьби з даним захворюванням є впровадження специфічної профілактики, успіх якої залежить від якості вакцин. Перевага надається вакцинам, виготовленим на основі адаптованих до клітинних культур штамів завдяки можливості високого рівня накопичення вірусмісної сировини та простоті технологічного регламенту їх виготовлення [1, 5]. Більш того – культуральні вірус-вакцини, крім технологічних переваг при їх виготовленні, також мають переваги і щодо імунологічних властивостей, оскільки вони містять мінімум баластних білкових речовин. При цьому в якості системи культивування найбільш доцільно використовувати прості за технологією виготовлення і низькі по собівартості клітинні культури, як приклад – первинно трипсинізовані культури фібробластів птиці [2, 3].

Метою даної роботи були дослідження здатності вірусу інфекційної бурсальної хвороби до культивування в різних біологічних системах.

Матеріали та методи. Вірус. Сухий штам 2512 вірусу інфекційної бурсальної хвороби, адаптований на 9–10-ти добових ВПФ – курячих ембріонах одним пасажем.

Культури клітин. Первинно – трипсинізовані культури курячих фібробластів, виготовлених з комерційних та ВПФ – 9–10 – добових ембріонів.

Курчата. 40 – добові курчата – бройлери.

Поживні середовища, розчини, реактиви. Поживні середовища 199 та Ігла (ДМЕМ) виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина», сироватка крові великої рогатої худоби (ВРХ) виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»; полістиролові планшети для ІФА виробництва NUNK типу Maxisorb (Данія).

Культивування штаму вірусу ІВХ здійснювали на первинно – трипсинізованій культурі курячих фібробластів, яку отримували із шкірно-м'язової тканини 9–10 – добових курячих комерційних і ВПФ ембріонів за загальноприйнятою та модифікованою нами методикою. Культуру фібробластів вирощували у флаконах і матрасах на живильних середовищах Ігла та 199 вітчизняного виробництва з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби. Для підтримки життєздатності інфікованих досліджуваним вірусом культур клітин використовували суміш цих середовищ у рівних пропорціях з додаванням 2 % сироватки крові великої рогатої худоби. Характер цитопатичних змін вивчали за допомогою інвертованого мікроскопу «Біолам П-1» («Ломо»).

Результати досліджень. На початкових етапах нашої роботи ми визначали оптимальну посівну концентрацію клітинної суспензії для одержання повного моношару через 24 години. З цією метою відпрацьовували декілька варіантів концентрації клітин у суспензії. Результати досліджень представлені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Формування моношару при різних посівних концентраціях клітинної суспензії ФЕК

№ з/п	Посівна концентрація клітинної суспензії, $\times 10^5$ кл/см ³	Відсоток формування клітинного моношару, год			
		12	24	36	48
1	5,0	5-10	20-40	50-60	70-90
2	7,0	10-20	40-50	60-70	80-90
3	8,0	50-70	90-100	100	100
4	10,0	70-90	90-100	100	100

На підставі даних, наведених у таблиці 1, найбільш оптимальними посівними концентраціями для одержання повного моношару через 24 години були концентрації клітин у посівній суспензії 8×10^5 та 10×10^5 кл/см³. Більш низькі концентрації клітин не забезпечували формування повного моношару за 24 години. Зразки культур ФЕК використовували як на скляних, так і на пластикових носіях. З економічної точки зору в подальшому використовували посівну концентрацію клітин 8×10^5 кл/см³ у флаконах зі скла та 10×10^5 кл/см³ у пластикових матрасах одержаних як з комерційних ембріонів, так і при використанні культури ФЕК із ВПФ ембріонів.

Інфікування культур клітин виконували двома способами:

1. Контакт культури з досліджуваним штамом вірусу ІВХ протягом 30 хв за температури 37 °С у розведенні 1:10.
2. Додавання вірусу безпосередньо у підтримуюче середовище у розведенні 1:3.

Після інфікування перші прояви ЦПД у культурах спостерігали при застосуванні першого способу. При застосуванні другого способу інфікування культур клітин прояви ЦПД були менш характерні та помітні та проявлялись пізніше в порівнянні із застосуванням першого способу. Динаміка цитопатичних змін після контакту культури з досліджуваним штамом вірусу у розведенні 1:10 представлена в таблиці 2.

Таблиця 2 – Динаміка ЦПД штаму вірусу ІВХ на культурі клітин курячих фібробластів

Використані культури	Терміни та характер прояву ЦПД				
	24 год	48 год	72 год	96 год	120 год
Культура ФЕК з комерційного яйця	Без змін	Без змін	Округлення клітин	Руйнування моношару 30%	Руйнування моношару 90%
Культура ФЕК з ВПФ - ембріону	Без змін	Округлення клітин	Руйнування моношару 40%	Руйнування моношару 70%	Руйнування моношару 90%

Як видно з даних таблиці 2, перші характерні зміни моношару спостерігали через 48 годин на культурі ФЕК з ВПФ – ембріону. Вони характеризувалися округленням клітин, а через 72 години руйнування моношару було виражено на 40 %, до 120 години культивування – на 90 %.

Аналогічні зміни моношару проявлялись на культурі ФЕК з комерційних ембріонів лише через 72 години, а перші руйнування моношару з осередками дегенерації клітин – через 96 годин і були виражені на 30 %.

Затримку прояву ЦПД на культурі ФЕК з комерційних ембріонів можна пояснити наявністю в них залишкових материнських антитіл та їх впливом на вірус ІВХ. Усі зразки, які мали характерні ознаки ЦПД, були перевірені на відсутність контамінації бактеріальною мікрофлорою згідно з ДСТУ 4483 на тьогліколевому середовищі. Їх зберігали за температури мінус 20 °С.

З метою адаптації досліджуваного штаму вірусу інфекційної бурсальної хвороби до культур клітин ФЕК (отриманих як із комерційного яйця, так і з ВПФ – ембріонів) було проведено 9 послідовних пасажів. На рівні окремих пасажів проводили визначення титру інфекційної активності даного штаму. Результати досліджень наведені в таблиці 3.

Таблиця 3 – Рівень накопичення вірусу ІБХ у культурах клітин різного походження

Використані культури	Титр інфекційної активності штаму вірусу ІБХ, Іg ТЦД ₅₀ /см ³					
	4 пасаж	5 пасаж	6 пасаж	7 пасаж	8 пасаж	9 пасаж
Культура ФЕК з комерційного яйця	3,0±0,14	3,0±0,14	3,0±0,14	3,0± 0,17	3,0± 0,18	3,0± 0,18
Культура ФЕК з ВПФ - ембріону	-	-	-	-	-	4,75±0,25

Як показують дані таблиці 3, титр інфекційної активності досліджуваного штаму вірусу ІБХ на культурі ФЕК із комерційного яйця максимально складав 3,0 Іg ТЦД₅₀/см³ після 4 пасажу та продовжував зберігатись до 9 пасажу. Культивування вірусу на культурі клітин ФЕК з ВПФ-ембріонів привело до поступового зростання титру інфекційної активності після 8 пасажу, його титр складав 4,75 Іg ТЦД₅₀/см³.

Для вивчення антигенних властивостей адаптованого штаму з титром 3,0 Іg ТЦД₅₀/см³ проводили імунізацію 10 курчат – бройлерів віком 40 діб. Вірусний матеріал вводили внутрішньом'язово в область стегна по 0,5 см³. Після імунізації відбирали проби крові на 10, 15, 21 доби для визначення рівня антитіл методом ІФА.

За результатами ІФА було встановлено, що на 10 добу після імунізації 20% проб були серопозитивними з середнім титром 241±317. На 15 добу серопозитивність зросла до 60 % з середнім титром 548±506. На 21 добу після інфікування кількість позитивних проб зменшилась до 20 %, а середній титр антитіл складав 269±280 (рис. 1).

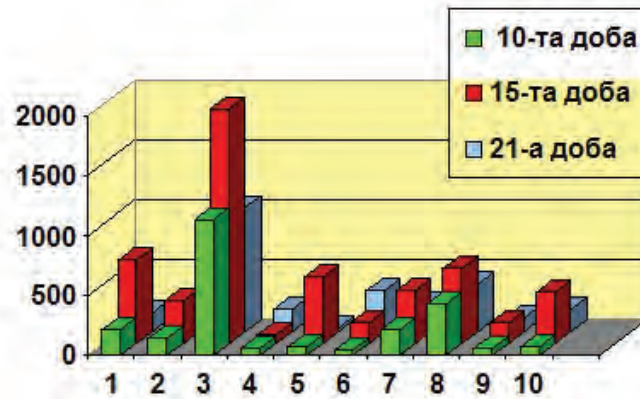


Рис. 1. Коливання титрів антитіл у позитивних зразках сироваток крові курчат-бройлерів

Таким чином, на підставі одержаних даних можна зробити висновок про те, що культуральна розплідка досліджуваного штаму вірусу інфекційної бурсальної хвороби на четвертому пасажі являється антигенно активною та викликає утворення антитіл.

Висновки. 1. Встановлено здатність забезпечення репродукції штаму 2512 вірусу інфекційної бурсальної хвороби в культурі клітин фібробластів курячих ембріонів.

2. Вірус активно культивувався на культурі клітин ФЕК, отриманої з комерційного яйця. Після пасажу інфекційний титр становив 3,0 Іg ТЦД₅₀/см³ і зберігався до кінцевого терміну пасажування.

3. З метою мінімізації впливу материнських антитіл на комерційних ембріонах культивування вірусу ІБХ було проведено на ФЕК, отриманих з ВПФ – ембріонів. При цьому характерні зміни ЦПД проявлялися раніше – через 48 год та спостерігалось зростання титру інфекційної активності до 4,75 Іg ТЦД₅₀/см³.

4. У результаті вивчення антигенних властивостей адаптованого штаму 2512 вірусу інфекційної бурсальної хвороби встановлено, що він антигенно активний і призводить до напрацювання антитіл.

Список літератури

1. Алиев А.С. Инфекционная бурсальная болезнь /А.С. Алиев.- С.-Петербург, 2010.- 250 с.
2. Бакулин В.А. Болезни птиц / В.А. Бакулин. - СПб., 2006. - С. 762.
3. Малахова Л.В. Культивирование вируса оспы птиц в перевиваемых и первично – трипсинизированных культурах клеток /Л.В. Малахова, К.Ю. Федосеев, М.С. Кукушкина // Ветеринария сегодня.- 2014.- №2. –С. 28 – 33.
4. Рула О. М. Шляхи забезпечення епізоотичного благополуччя птахогосподарств України щодо інфекційної бурсальної хвороби (хвороби Гамборо) / О.М. Рула // Ветеринарна медицина.- 96. – 2012.- С. 230-232.
5. Сюрин В.Н. Диагностика вирусных болезней животных: справочник / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина.- М.: Агропромиздат, 1991.- 528 с.

THE ABILITY TO CULTIVATE OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS IN VARIOUS BIOLOGICAL SYSTEMS

Stegniy B. T., Potrjasajeva O. O., Muzyka D. V., Rula O. M.

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

Outcome of selection of culture system for fowl strain virus IBD is presented in the paper. Primary trypsinized chicken embryo fibroblast culture were found to be more efficient.

Materials and methods. IBV virus strain cultivation has been conducted on primary trypsinized chicken embryo fibroblast culture, which has been received from skin and muscle tissue of 9-10-day old commercial and SPF-embryos using the developed and modified technique. Fibroblast culture has been grown in bottles and mattresses on domestically produced Eagle's and 199 minimal essential media ma 199 with addition of 10% bovine blood serum.

Results. 8×10^5 ma 10×10^5 cells per sm^3 were optimal inoculum concentrations for obtaining of a complete monolayer in 24 hours. The first specific changes in monolayer have been seen 48 hours later on FCE culture from SPF-embryo. 72 hours later destruction of the monolayer was expressed by 40%, to 120 hours of cultivation – by 90%. To adapt the test strain of infectious bursal disease virus to FCE cell cultures (prepared both from commercial eggs, and from SPF-embryos), 9 serial passages have been conducted. Titer of infectious activity of IBV test strain on FCE culture from commercial eggs was 3,0 lg CPE₅₀/sm³ after 4th passage and preserved until 9th passage. Virus cultivation on FCE culture from SPF-embryos led to gradual increase of infectious activity titer after 8th passage and it was до 4,75 lg CPE₅₀/sm³. 40 days-old broiler chickens' immunization in amount of 10 goals has been conducted to study antigenic features of adapted strain with titer 3,0 lg CPE₅₀/sm³.

Conclusions. Virus has been actively cultivated on FCE cell culture made from commercial eggs. After 4th passage infectious titer was 3,0 lg CPE₅₀/sm³ and persisted until the final term of passaging. Using FCE cell culture obtained from SPF-embryos specific changes of CPE appeared earlier – 48 hours later. As a result of studies of adapted strain of infectious bursal disease virus 2512 antigenic features it has been found that it is antigenically active and causes the antibody production in broiler chickens.

Keywords: virus IBD, culture, cell culture, infectious activity

УДК: 619:616.98:578.826.1:636.5

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМУ «CRIMEA`07»
ВІРУСУ СИНДРОМУ ЗНИЖЕННЯ НЕСУЧОСТІ

Ткаченко С. В., Стегній М. Ю., Музика Д. В., Стегній А. Б., Рула О. М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»
м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Метою даної роботи було проведення серії вірусологічних, молекулярно-генетичних та серологічних досліджень виділеного у 2007 році на території АР Крим епізоотичного ізоляту вірусу синдрому зниження несучості. Проведеними дослідженнями встановлено відсутність бактеріальної та грибової забрудненості, а також контамінації сторонніми вірусами та мікоплазмами вірусемітуючої рідини, гемаглютинуюча активність штаму становила $16 \log_2$ (1:65536), інфекційний титр матрової розплодки вірусу дорівнював $9,0 \text{ EID}_{50}/_{0,2\text{cm}^3}$. За результатами проведених досліджень усі показники відповідали зазначеним у паспорті до штаму, після чого вірус був задепонований в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ) та отримав реєстраційний номер 617.

Ключові слова: птахівництво, синдром зниження несучості, депонування, штам

Синдром зниження несучості – вірусне захворювання птиці, у тому числі курей, качок, гусей та лебедів [1]. Термін «зниження несучості» відноситься до зниження виробництва яєць, що є головною ознакою захворювання, для якої не характерні інші патогномоністичні ознаки. Захворювання супроводжується появою яєць з тонкою шкаралупою або навіть без неї. Збудником є качиний аденовірус (*Duck adenovirus 1*) роду *Atadenovirus*.

Зазначений ізолят було виділено у 2007 році в АР Крим під час спалаху вірусного захворювання невідомої етіології [2].

Метою даної роботи було проведення серії бактеріальних, вірусологічних, молекулярно-генетичних і серологічних досліджень з метою депонування виділеного у 2007 році на території АР Крим епізоотичного ізоляту вірусу синдрому зниження несучості.

Матеріали та методи. Дослідження з визначення наявності механічних домішок, плісняви, порушення герметичності, закоркування та етикетування визначали візуально. Визначення відсутності контамінації вірус утримуючого матеріалу сторонньою бактеріальною та грибовою мікрофлорою проводили згідно з ДСТУ 4483.