

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 вірусеміщуючої 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.

Для проведення контролю біологічної активності штаму вірусу готували по 10 стерильних флаконів, вносили в них по 9 см³ стерильного фосфатно-сольового буфера. У перший з них стерильною піпеткою вносили 1 см³ ліофілізованого й розчиненого штаму вірусу, 3 рази піпетували і переносили 1 см³ суміші до другого флакону. Потім новою стерильною піпеткою тричі піпетували суміш у другій пробірці та переносили 1 см³ суміші у третій флакон і т.д. Таким чином, було отримано десятикратні розведення вірусу від 10⁻¹ до 10⁻¹⁰. Кожним розведенням вірусотримуючого матеріалу в об'ємі 0,2 см³ інфікували по 4 ембріони качок, починаючи з найбільшого розведення (10⁻¹⁰).

У процесі інкубації ембріони овоскопували раз на добу. Ембріони, які загинули впродовж перших 24 годин, знищували. Через 5 днів інкубації всі ембріони охолоджували за температури 4–6 °С впродовж 32 годин.

Після охолодження ембріони розтинали, патогенність вірусу оцінювали за наявністю гемаглютинаційної активності порівняно з контролем.

Визначення належності штаму до вірусу синдрому зниження несучості проводили шляхом постановки реакції затримки гемаглютинації. Для цього використано референтні сироватки до вірусів грипу підтипів Н1–Н16, параміксовірусів 1–4 та 6–9 підтипів і синдрому зниження несучості (виробництва Veterinary Laboratories Agency (Вейбрідж, Велика Британія).

Дослідження щодо наявності генетичного матеріалу вірусу СЗН, а також можливої наявності генетичного матеріалу мікоплазм у представлений пробі проводили в полімеразно-ланцюговій реакції. Ізоляцію сумарної нуклеїнової кислоти проводили за допомогою «РІБО-СОРБ» (Російська федерація).

Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою комерційного набору «RT-PCR Core» виробництва фірми IsoGene (Російська Федерація). Реакцію ампліфікації проводили за допомогою комерційного набору «PCR-Core» виробництва фірми IsoGene (Російська Федерація) та систем праймерів:

- Eds fib 1/ Eds fib 2 – для ідентифікації генетичного матеріалу синдрому зниження несучості;
- F1/R1 – для ідентифікації генетичного матеріалу мікоплазм.

Результати досліджень. Депонування епізоотичного штаму вірусу синдрому зниження несучості складалося з декількох етапів. На першому проводили визначення зовнішнього вигляду вмісту флаконів з ліофілізованою вірусвміщуючою масою. Для цього кожний флакон ретельно переглядали у проникаючому світлі. Штам вірусу являв собою суху пористу масу жовтуватого кольору.

При візуальному огляді флакону з ліофілізованим вмістом сторонніх домішок, плісняви та зміни консистенції не виявлено. Також не виявлено тріщин на флаконах і порушення герметичності закоркування. Усі флакони мали етикетки, на яких вказано назву вірусу, назву штаму, дату отримання.

На наступному етапі (після розчинення ліофілізованого вмісту флакону) проводили визначення відсутності контамінації сторонньою бактеріальною та грибовою мікрофлорою шляхом посіву на тіогликолеве середовище. Протягом усього строку спостереження в жодній пробірці та жодному флаконі не виявлено ознак росту мікрофлори.

Контроль біологічної активності штаму вірусу проводили за загальноприйнятою методикою на качиних ембріонах. Динаміка загибелі ембріонів, наявність чи відсутність гемаглютинації наведено в таблиці.

Таблиця – Динаміка загибелі ембріонів, наявність чи відсутність гемаглютинації

Розведення	К-ть ембріонів	Доба спостереження					наявність або відсутність аглютинації еритроцитів
		перша	друга	третья	четверта	п'ята	
10 ⁻¹	4	–	–	–	1*	3	++++
10 ⁻²	4	–	–	–	–	2	++++
10 ⁻³	4	–	–	–	–	–	++++
10 ⁻⁴	4	–	–	–	–	–	++++
10 ⁻⁵	4	–	–	–	–	–	++++
10 ⁻⁶	4	–	–	–	–	–	++++
10 ⁻⁷	4	–	–	–	–	–	++++
10 ⁻⁸	4	–	–	–	–	–	++++
10 ⁻⁹	4	–	–	–	–	–	++++
10 ⁻¹⁰	4	–	–	–	–	–	-----

Примітка: * – цифрами позначено кількість ембріонів, що загинули

Інфекційний титр розраховували за формулою Ріда і Менча. За результатами досліджень інфекційний титр вірусу склав 9,0 EID50/_{0,2см³}.

При постановці реакції затримки гемаглютинації (РЗГА) використовували робочу дозу антигену 4 ГАО та розраховували її з урахуванням титру антигену, попередньо визначеного в реакції гемаглютинації. Аглютинація еритроцитів спостерігалась в розведенні 1:65536.

Надалі проводили постановку РЗГА з референтними сироватками до вірусів грипу підтипів Н1–Н12 (рисунок 1), підтипів Н13–16, параміксовірусів 1–4 та 6–9 підтипів (рисунок 2).

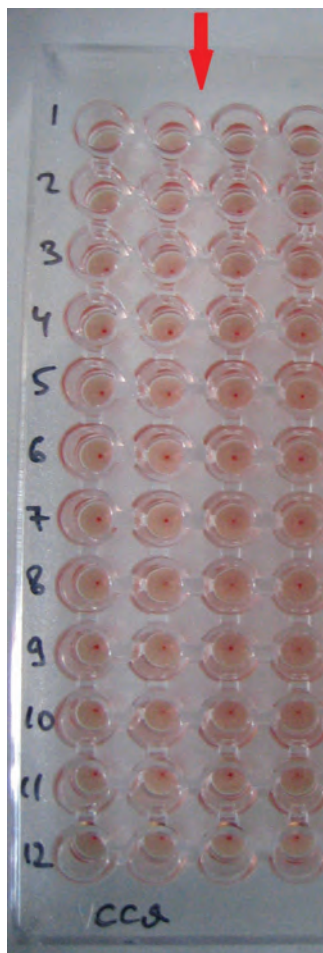


Рис. 1. Результати РЗГА з референтними сироватками до вірусу грипу підтипів Н1–Н12

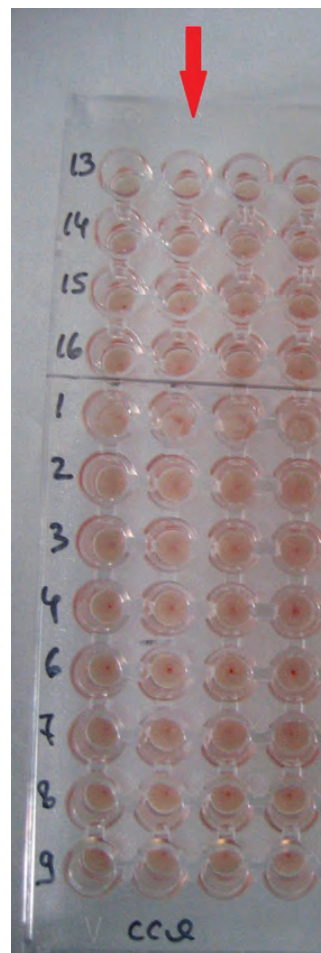


Рис. 2. Результати РЗГА з референтними сироватками до вірусу грипу підтипів Н13–Н16 та параміксовірусів підтипів 1–4 та 6–9

Тож, затримки аглютинації еритроцитів не спостерігалося з жодною з референтних сироваток, що доводить відсутність у вірусмішучій рідині інших аглютинуючих вірусів.

З референтною до вірусу синдрому зниження несучості сироваткою вірус «Crimea`07» зреагував у розведенні 1:2048 у той час, як з іншими сироватками затримки аглютинації не спостерігали.

За результатами постановки ПЛР встановлено, що представлений зразок містить генетичний матеріал вірусу синдрому зниження несучості та є вільним від генетичного матеріалу мікоплазм (протокол лабораторії молекулярної діагностики та епізоотології ННЦ «ІЕКВМ» №78/2015 від 29.05.2015 р.).

Висновок. Представлений зразок штаму «Crimea`07» вірусу синдрому зниження несучості відповідає паспортним даним за перевіреними показниками та задепонований у Національному центрі штамів мікроорганізмів Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ) під реєстраційним номером 617.

Перспективи подальших досліджень. Зазначений депонований штам вірусу СЗН планується використати як один з компонентів вірус-вакцин «АвіВак-ІЕКВМ – вакцина асоційована інактивована для специфічної профілактики ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту курей та синдрому зниження несучості» та «АвіВак-ІЕКВМ-2 – вакцина асоційована інактивована для специфічної профілактики ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту, інфекційної бурсальної хвороби курей та синдрому зниження несучості».

Список літератури

1. Smyth, J. A. Overview of egg drop syndrome '76 in poultry [Electronic resource] / J. A. Smyth // The Merck Veterinary Manual / S E. Aiello (ed.). — November, 2013. — Mode to access : URL : http://www.merckvetmanual.com/mvmpoultry/egg_drop_syndrome_76/overview_of_egg_drop_syndrome_76_in_poultry.html. — Title from the screen.
2. Ткаченко, С. В. Особливості прояву синдрому зниження несучості-76 в птахогосподарстві на півдні України та вивчення властивостей збудника захворювання [Текст] / С. В. Ткаченко, А. І. Бузун, А. П. Герілович // Міжвід. тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина» №88, Харків – 2007. – С. 255-259.

STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF EGG DROP SYNDROME VIRUS STRAIN «CRIMEA`07»

Tkachenko S. V., Stegnyy M. Yu., Muzyka D. V., Stegnyy A. B., Rula O. M.

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

The aim of this work was a series of virological, molecular, genetic and serological studies selected in 2007 in AR Crimea epizootic isolate of egg drop syndrome virus. Conducted research found free of bacterial and fungal contamination, and contamination by foreign viruses and mycoplasmas virus fluid hemagglutination activity strain was $16 \log_2$ (1:65,536), infectious virus titer equal to $9.0 \text{ EID}_{50} / 0,2 \text{ cm}^3$. The results of the research answered all figures mentioned in the passport to the strain, after which the virus was deposited in the State Scientific Control Institute of Biotechnology and strains (Kyiv) registration number 617.

Keywords: poultry, egg drop syndrome, deposit, strain

УДК: 619:616.98-036.22:578.826.1:636.5(477)

ВИВЧЕННЯ ДИНАМІКИ КОЛИВАННЯ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ СИНДРОМУ ЗНИЖЕННЯ НЕСУЧОСТІ У РІЗНОВІКОВИХ КУРЕЙ

Ткаченко С. В.

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

У статті наведена інформація щодо вивчення динаміки коливання антитіл до вірусу синдрому зниження несучості (СЗН) серед курей-несучок віком 107–503-доби, яке визначалося протягом 2010–2014 років на території 2 приватних та 15 промислових птахівничих підприємств 8 областей України. Так, за результатами проведених 1422 досліджень встановлено, що титри антитіл до зазначеного вірусу в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА) коливалися від 0 до $13 \log_2$, середні титри були мінімальними у 2014 році та складали $4,79 \pm 4,6 \log_2$, а їх максимальний рівень діагностували у 2010 році ($8,64 \pm 2,87 \log_2$).

Ключові слова: вірус, синдром зниження несучості, титри антитіл, реакція затримки гемаглютинації

Синдром зниження несучості – захворювання курей-несучок, яке викликає епітеліотропний аденовірус роду *Atadenovirus*, родини *Adenoviridae*. Воно характеризується зниженням яєчної продуктивності та кладкою яєць з де пігментованою, тонкою та/або крихкою шкаралупою. Іноді трапляються випадки появи рідкого вмісту яйця зовсім без шкаралупи.

Збудник захворювання може викликати патологію з боку органів дихальної системи у гусенят і качок [1, 2]. Вірус викликає аглютинацію еритроцитів широкого спектру птахів, що з успіхом використовується в діагностиці цього захворювання.

Окрім РЗГА, для діагностики цього захворювання використовують інші серологічні методи (імуноферментний аналіз, реакція імунофлуоресценції, а також метод рестрикційного аналізу геному аденовірусу, який потребує додатково ще виділення геномної ДНК у великій кількості) [6, 7].

Метою наших досліджень було проведення моніторингу стосовно наявності антитіл до вірусу синдрому зниження несучості у курей-несучок різного віку на території України протягом 2010–2014 років за використання РЗГА.

Матеріали та методи. Кров від курей-несучок отримували з 2 приватних та 15 промислових птахівничих підприємств Вінницької, Дніпропетровської, Донецької, Івано-Франківської, Луганської, Миколаївської, Харківської, та Хмельницької областей. У якості позитивного антигену використовували штами «L-497» та «Crimea`07», які отримували шляхом інфікування 10–11-добових качиних ембріонів. Отримання вірусвміщуючої рідини та її інактивацію формаліном проводили згідно зі стандартними методиками.

Позитивну сироватку отримували від кролів породи Шиншила, яких гіперімінували інактивованою вакциною проти СЗН зі штаму BC-14 фірми «Intervet International B.V.» згідно з експериментально відпрацьованою у відділі схеми. Постановку РЗГА здійснювали згідно методикам, рекомендованими Міжнародним епізоотичним бюро.

Результати досліджень. Синдром зниження несучості відноситься до економічно значущих інфекцій, проте це захворювання потребує обов'язкової вакцинопрофілактики у птахогосподарствах України.

Завдяки діагностичним дослідженням, які проводяться у відділі з вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» протягом останніх десятиліть, можна прослідкувати коливання динаміки наявності антитіл у сироватках крові курей-несучок у птахогосподарствах України.

На рисунках 1–5 представлено діаграми, на яких зазначено кількість сироваток крові з відповідними титрами антитіл у період з 2010 по 2014 роки.